

**UJI ANTIMIKROBA EKSTRAK METANOL
BEBERAPA SPONS ASAL PULAU BARRANG LOMPO DAN
PROFIL KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS**

**OLEH
ARIANTY HARRY
H 511 99 019**



UNIVERSITAS HASANUDDIN	
Tgl. Pengambilan	21-07-04
Uraian	MTK 8 PD
Jumlah	1 (satu) Exp
Harga	Hadiah
No. Inventaris	U/07/04 088
No. Klas	23432

**JURUSAN FARMASI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2004**

SKRIPSI

OLEH

ARIANTY HARRY

H 511 99 019



JURUSAN FARMASI

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS HASANUDDIN

MAKASSAR

2004

**UJI ANTIMIKROBA EKSTRAK METANOL
BEBERAPA SPONS ASAL PULAU BARRANG LOMPO DAN
PROFIL KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS**

OLEH

ARIANTY HARRY

H 511 99 019

Skripsi untuk melengkapi tugas dan memenuhi syarat

untuk memperoleh gelar sarjana

JURUSAN FARMASI

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS HASANUDDIN

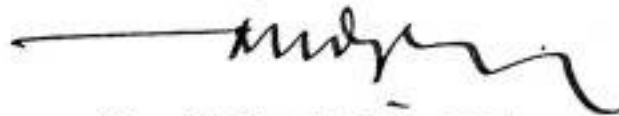
MAKASSAR

2004

**UJI ANTIMIKROBA EKSTRAK METANOL
BEBERAPA SPONS ASAL PULAU BARRANG LOMPO DAN
PROFIL KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS**

Disetujui Oleh :

Pembimbing Utama



(Drs. M. Natsir Djide, M.S)

NIP : 130 785 083


Pembimbing Pertama



(Dra. Rahmawati Syukur)

NIP : 132 012 988

Pembimbing Kedua



(Drs. H. Burhanuddin Taebe)

NIP : 130 784 251

Pada tanggal : Makassar,

Juli 2004

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji dan syukur ke hadirat ALLAH SWT karena atas berkat dan rahmat-Nya penulis dapat melalui segala hambatan dan rintangan dalam menyelesaikan studi, penelitian dapat berjalan dengan lancar dan juga skripsi ini dapat selesai disusun.

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan banyak terima kasih yang tak terhingga kepada Bapak Drs. M. Natsir Djide, M.Si selaku pembimbing utama, Ibu Dra. Rahmawati Syukur selaku pembimbing kedua, Bapak Drs. Burhanuddin Taebe selaku pembimbing kedua dan Juga Bapak Drs. Gemini Alam yang telah meluangkan waktu dan tenaga untuk memberikan ilmu dan juga pengarahan yang tak terhingga dalam penelitian ini hingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi ini

Ucapan terima kasih juga tak lupa penulis sampaikan kepada :

1. Bapak Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan alam Universitas Hasanuddin
2. Bapak Ketua Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin
3. Ibu Dra. Hj. Asnah Marzuki, M.Si selaku penasehat akademik
4. Bapak/Ibu Kepala Laboratorium di Lingkungan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam khususnya Jurusan Farmasi Universitas Hasanuddin
5. Bapak/Ibu Dosen Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam khususnya Jurusan Farmasi Universitas Hasanuddin



6. Seluruh staf dan karyawan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin. Khususnya K'Lia, Feby dan P' syuaib terima kasih atas bantuannya dalam penelitian ini.

Perhargaan terbesar dan tak terhingga penulis berikan kepada Ayahanda tercinta H.Harry Usman dan ibunda tersayang Hj. Nining Purwaningsih karena berkat doa restu yang tiada henti-hentinya dan juga pengorbanan dalam bentuk materil dan kasih sayangnya sehingga penulis dapat menyelesaikan pendidikan ini. Tak lupa juga kepada Bupo, Nenek, Om Iqbal& kel, Om Rusmin&kel, dan seluruh keluarga besar Martodiputro atas doanya kepada penulis. Kepada saudara-saudaraku tercinta Mba' acci, Beybow, De'Ika & Adit thanks for everything.

Kakanda Acha yang jauh di Bandung, Jatinangor terima kasih atas kasih sayang, kekuatan, tenaga, dan juga doa kepada penulis walaupun jauh kakanda tetap memberi dorongan agar penulis kuat dan juga sabar dalam menghadapi cobaan.

Kepada Keluarga Besar Angkatan'99 khususnya Ade kebersamaan kita selama ini memberikan arti persahabatan yang cukup besar dan akhirnya skripsi kita bersama juga dapat selesai, buat Atun, Casey, Endang dan K'Rahim, bang Edi, Eni, Tasya, Susi dan semuanya yang tak bisa penulis sebutkan satu persatu thanks atas kebersamaan kita selama 4 tahun lebih banyak kenangan indah yang penulis dapatkan dan kenangan itu tak mudah untuk dilupakan semoga kita semua dapat sukses untuk meraih cita-cita ke depan dan persahabatan kita bersama tidak hilang dengan berjalannya waktu. Amin.

Kepada teman-teman KKN Posko Wanua Waru terima kasih Ade, Acing, Anny, Ima, Cia, K'Nilam dan Ida banyak penulis belajar mengenai agama Islam selama disana juga tak lupa buat Pakde dan Bude.

Penulis menyadari bahwa tiada sesuatu yang diciptakan Allah yang sempurna sehingga demikian pula skripsi ini tak luput pula dari kesalahan sehingga masih jauh dari yang diharapkan semoga skripsi ini dapat berguna dan memberi manfaat bagi kita semua khususnya dalam bidang Farmasi. Amin.

Makassar, April 2004

Penulis

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian uji antimikroba dari ekstrak metanol beberapa spons asal Pulau Barrang Lompo dan Penentuan Profil Kromatografi Lapis Tipis (KLT) terhadap *Escherichia coli* ATCC 25923 dan *Bacillus subtilis* ATCC 6633, dengan tujuan untuk memperoleh data ilmiah tentang aktivitas antimikroba dari spons tersebut. Uji mikrobiologis dilakukan dengan metode dilusi untuk penentuan konsentrasi terendah yang dapat menghambat bakteri uji dan metode difusi untuk mengukur aktivitas antimikroba berdasarkan zona hambatan yang terbentuk dari 5 konsentrasi ekstrak yang diuji yaitu 0,25%; 0,5%; 0,75%; 1,0% ; dan 1,25%, pada medium GNA setelah diinkubasi selama 24 jam. Data zona hambatan dianalisis dengan rancangan faktorial dilanjutkan dengan uji Duncan yang menunjukkan bahwa semua konsentrasi uji mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji. Penelitian dilanjutkan dengan KLT-Bioautografi untuk menguji kemampuan ekstrak dalam menghambat bakteri yang dipindahkan dari kromatogram ke media agar. Zona hambatan yang ditunjukkan oleh adanya noda aktif dari ekstrak yang dipisahkan dengan KLT dengan menggunakan cairan pengelusi Etil asetat : Metanol : air (5:2:1). Hasil pengamatan menunjukkan bahwa ekstrak metanol BRLP-3 memberikan aktifitas antimikroba yang paling baik untuk kedua bakteri uji yang digunakan.

ABSTRACT

An antimicrobial assay effect of methanol extract some sponges from Barrang Lompo Island and determination of Chromatography Thin Layer Profile to *Escherichia coli* ATCC 25923 and *Bacillus subtilis* ATCC 6633, with purpose to get the scientific data about the anti microbial ability from those sponges have been done. Microbiology test do by dilution method for determining minimum concentration to inhibit the growth of bacterial test and difusion method for measure the antimicrobial activity according to the inhibition zone which shaped from five concentration extract that tested, those are 0,25%; 0,5%; 0,75%; 1,0% ; dan 1,25%, to the GNA medium after incubation for 24 hours. The inhibition zone data analyzed by factorial design method followed by Duncan method which show that all concentration can inhibit the growth of bacterial test. Furthermore, an assay do by TLC-Bioautographic to test extract ability in inhibit bacterial which transferred from chromatogram to agar media. Inhibition zone which showed by active spot from extract separated by TLC by used eluent Ethil Acetate : Methanol : Water (5:2:1). The result of perception showed that methanol extract BRLP-3 give the best antimicrobial activity for both bacterial test which used.

DAFTAR ISI

	Halaman
JUDUL	i
UCAPAN TERIMA KASIH	iv
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB I PENDAHULUAN	1
BAB II POLA PENELITIAN	4
BAB III TINJAUAN PUSTAKA	6
III.1 Uraian Sampel Spons	6
III.1.1 Morfologi Spons Laut	6
III.1.2 Reproduksi Spons	10
III.1.3 Kandungan Kimia Spons	11
III.2 Metode Ekstraksi Bahan Alam	12
III.2.1 Tujuan Ekstraksi	12
III.2.2 Jenis-Jenis Ekstraksi Bahan Alam	13
III.2.3 Ekstraksi secara maserasi	13
III.3 Metode Kromatografi	14
III.3.1 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	15
III.4 Uraian Metode Bioautografi	18
III.5 Mekanisme Kerja Antimikroba	22
III.6 Uraian Bakteri Yang Digunakan	26
III.6.1 <i>Escherichia coli</i>	26
III.6.2 <i>Bacillus subtilis</i>	27

III.7 Uraian Umum Uji Mikrobiologis	28
III.7.1 Metode Pengenceran.....	28
III.7.2 Metode Difusi	29
III.8 Uraian Umum Tetrasiklin HCl	31
BAB IV METODE PENELITIAN.....	33
IV.1 Penyiapan Alat dan Bahan.....	33
IV.1.1 Alat-Alat yang digunakan.....	33
IV.1.2 Bahan-Bahan yang digunakan.....	34
IV.1.3 Sterilisasi Alat.....	35
IV.1.4 Pembuatan Medium.....	36
IV.2 Penyiapan mikroba Uji.....	38
IV.2.1 Penyiapan Kultur Murni Mikroba Uji.....	38
IV.2.2 Pembuatan Suspensi Mikroba Uji.....	38
IV.3 Pembuatan Larutan Tetrasiklin HCl 30 ppm.....	39
IV.4 Penyiapan bahan Penelitian.....	39
IV.4.1 Pengambilan sampel.....	39
IV.4.2 Pengolahan sampel.....	39
IV.5 Ekstraksi Spons.....	39
IV.6 Pembuatan Suspensi Ekstrak Metanol Spons.....	40
IV.7 Pengujian Ekstrak.....	40
IV.7.1 Kosentrasi Hambatan Minimum (KHM)	41
IV.7.2 Penentuan Daerah Hambatan	41
IV.8 Pengujian Aktifitas Antimikroba.....	42
IV.9 Pendeteksian secara KLT-Bioautografi.....	42
IV.9.1 Pemisahan secara Kromatografi Lapis Tipis.....	42
IV.9.2 Pengujian secara KLT-Bioautografi	43
IV.10 Pengumpulan data.....	43
IV.11 Pembahasan Hasil Penelitian.....	43
IV.12 Pengambilan Kesimpulan.....	43
BAB V HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN.....	44
V.1 Hasil Penelitian	44
V.2 Pembahasan	47
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN.....	58
VI.1 Kesimpulan	58
VI.2 Saran	58
DAFTAR PUSTAKA	59
SKEMA KERJA	63

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Diameter Daerah Hambatan Pertumbuhan Bakteri <i>Bacillus subtilis</i> dan <i>Escherichia coli</i> yang dihasilkan oleh Ekstrak Metanol Spons BRLP-01.....	64
2. Diameter Daerah Hambatan Pertumbuhan Bakteri <i>Bacillus subtilis</i> dan <i>Escherichia coli</i> yang dihasilkan oleh Ekstrak Metanol Spons BRLP-02.....	65
3. Diameter Daerah Hambatan Pertumbuhan Bakteri <i>Bacillus subtilis</i> dan <i>Escherichia coli</i> yang dihasilkan oleh Ekstrak Metanol Spons BRLP-03.....	66
4. Diameter Daerah Hambatan Pertumbuhan Bakteri <i>Bacillus subtilis</i> dan <i>Escherichia coli</i> yang dihasilkan oleh Ekstrak Metanol Spons BRLP-04.....	67
5. Diameter Daerah Hambatan Pertumbuhan Bakteri <i>Bacillus subtilis</i> dan <i>Escherichia coli</i> yang dihasilkan oleh Ekstrak Metanol Spons BRLP-05.....	68
6. Nilai Rf dan warna Kromatogram Hasil Kromatografi Lapis Tipis Ekstrak Metanol Spons BRLP-01 pada penampak noda 366 nm dengan menggunakan cairan pengembang Etil asetat : Metanol : Air (5 : 2 : 1).....	69
7. Nilai Rf dan warna Kromatogram Hasil Kromatografi Lapis Tipis Ekstrak Metanol Spons BRLP-02 pada penampak noda 366 nm dengan menggunakan cairan pengembang Etil asetat : Metanol : Air (5 : 2 : 1).....	69
8. Nilai Rf dan warna Kromatogram Hasil Kromatografi Lapis Tipis Ekstrak Metanol Spons BRLP-03 pada penampak noda 366 nm dengan menggunakan cairan pengembang Etil asetat : Metanol : Air (5 : 2 : 1).....	70

9. Nilai Rf dan warna Kromatogram Hasil Kromatografi Lapis Tipis Ekstrak Metanol Spons BRLP-04 pada penampakan noda 366 nm dengan menggunakan cairan pengembang Etil asetat : Metanol : Air (5 : 2 : 1).....	70
10. Nilai Rf dan warna Kromatogram Hasil Kromatografi Lapis Tipis Ekstrak Metanol Spons BRLP-05 pada penampakan noda 366 nm dengan menggunakan cairan pengembang Etil asetat : Metanol : Air (5 : 2 : 1).....	71
11. Hasil Pengujian secara KLT-Bioautografi Ekstrak Metanol Spons BRLP-01.....	71
12. Hasil Pengujian secara KLT-Bioautografi Ekstrak Metanol Spons BRLP-02.....	72
13. Hasil Pengujian secara KLT-Bioautografi Ekstrak Metanol Spons BRLP-03.....	72
14. Hasil Pengujian secara KLT-Bioautografi Ekstrak Metanol Spons BRLP-04.....	73
15. Hasil Pengujian secara KLT-Bioautografi Ekstrak Metanol Spons BRLP-05.....	73

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Daerah Hambatan Pertumbuhan Bakteri Uji <i>Bacillus subtilis</i> setelah pemberian Ekstrak Metanol Spons BRLP-01 diinkubasi 1x24 jam, suhu 37°C.....	74
2. Daerah Hambatan Pertumbuhan Bakteri Uji <i>Escherichia coli</i> setelah pemberian Ekstrak Metanol Spons BRLP-01 diinkubasi 1x24 jam, suhu 37°C.....	74
3. Daerah Hambatan Pertumbuhan Bakteri Uji <i>Bacillus subtilis</i> setelah pemberian Ekstrak Metanol Spons BRLP-02 diinkubasi 1x24 jam, suhu 37°C.....	75
4. Daerah Hambatan Pertumbuhan Bakteri Uji <i>Escherichia coli</i> setelah pemberian Ekstrak Metanol Spons BRLP-02 diinkubasi 1x24 jam, suhu 37°C.....	75
5. Daerah Hambatan Pertumbuhan Bakteri Uji <i>Bacillus subtilis</i> setelah pemberian Ekstrak Metanol Spons BRLP-03 diinkubasi 1x24 jam, suhu 37°C.....	76
6. Daerah Hambatan Pertumbuhan Bakteri Uji <i>Escherichia coli</i> setelah pemberian Ekstrak Metanol Spons BRLP-03 diinkubasi 1x24 jam, suhu 37°C.....	76
7. Daerah Hambatan Pertumbuhan Bakteri Uji <i>Bacillus subtilis</i> setelah pemberian Ekstrak Metanol Spons BRLP-04 diinkubasi 1x24 jam, suhu 37°C.....	77
8. Daerah Hambatan Pertumbuhan Bakteri Uji <i>Escherichia coli</i> setelah pemberian Ekstrak Metanol Spons BRLP-04 diinkubasi 1x24 jam, suhu 37°C.....	77
9. Daerah Hambatan Pertumbuhan Bakteri Uji <i>Bacillus subtilis</i> setelah pemberian Ekstrak Metanol Spons BRLP-05 diinkubasi 1x24 jam, suhu 37°C.....	78

10. Dacrah Hambatan Pertumbuhan Bakteri Uji <i>Escherichia coli</i> setelah pemberian Ekstrak Metanol Spons BRLP-05 diinkubasi 1x24 jam, suhu 37°C.....	78
11. Bioautogram Ekstrak Metanol Spons BRLP-01 dengan cairan pengembang Etil Asetat : Metanol : Air = 5 : 2 : 1 dan bakteri uji <i>Bacillus subtilis</i>	79
12. Bioautogram Ekstrak Metanol Spons BRLP-01 dengan cairan pengembang Etil Asetat : Metanol : Air = 5 : 2 : 1 dan bakteri uji <i>Escherichia coli</i>	79
13. Bioautogram Ekstrak Metanol Spons BRLP-02 dengan cairan pengembang Etil Asetat : Metanol : Air = 5 : 2 : 1 dan bakteri uji <i>Bacillus subtilis</i>	80
14. Bioautogram Ekstrak Metanol Spons BRLP-02 dengan cairan pengembang Etil Asetat : Metanol : Air = 5 : 2 : 1 dan bakteri uji <i>Escherichia coli</i>	80
15. Bioautogram Ekstrak Metanol Spons BRLP-03 dengan cairan pengembang Etil Asetat : Metanol : Air = 5 : 2 : 1 dan bakteri uji <i>Bacillus subtilis</i>	81
16. Bioautogram Ekstrak Metanol Spons BRLP-03 dengan cairan pengembang Etil Asetat : Metanol : Air = 5 : 2 : 1 dan bakteri uji <i>Escherichia coli</i>	81
17. Bioautogram Ekstrak Metanol Spons BRLP-04 dengan cairan pengembang Etil Asetat : Metanol : Air = 5 : 2 : 1 dan bakteri uji <i>Bacillus subtilis</i>	82
18. Bioautogram Ekstrak Metanol Spons BRLP-04 dengan cairan pengembang Etil Asetat : Metanol : Air = 5 : 2 : 1 dan bakteri uji <i>Escherichia coli</i>	82
19. Bioautogram Ekstrak Metanol Spons BRLP-05 dengan cairan pengembang Etil Asetat : Metanol : Air = 5 : 2 : 1 dan bakteri uji <i>Bacillus subtilis</i>	83
20. Bioautogram Ekstrak Metanol Spons BRLP-05 dengan cairan pengembang Etil Asetat : Metanol : Air = 5 : 2 : 1 dan bakteri uji <i>Escherichia coli</i>	83

21. Kromatogram dari Ekstrak Metanol spons BRLP-01 dengan menggunakan cairan pengembang Etil Asetat: Metanol: Air (5:2:1) dengan penampak noda lampu UV 366 nm.....	84
22. Kromatogram dari Ekstrak Metanol spons BRLP-02 dengan menggunakan cairan pengembang Etil Asetat: Metanol : Air (5:2:1) dengan penampak noda lampu UV 366 nm.....	84
23. Kromatogram dari Ekstrak Metanol spons BRLP-03 dengan menggunakan cairan pengembang Etil Asetat: Metanol : Air (5:2:1) dengan penampak noda lampu UV 366 nm.....	85
24. Kromatogram dari Ekstrak Metanol spons BRLP-04 dengan menggunakan cairan pengembang Etil Asetat: Metanol : Air (5:2:1) dengan penampak noda lampu UV 366 nm.....	85
25. Kromatogram dari Ekstrak Metanol spons BRLP-05 dengan menggunakan cairan pengembang Etil Asetat: Metanol : Air (5:2:1) dengan penampak noda lampu UV 366 nm.....	86
26. Foto Spons BRLP-01.....	122
27. Foto Spons BRLP-02.....	122
28. Foto Spons BRLP-03.....	123
29. Foto Spons BRLP-04.....	123
30. Foto Spons BRLP-05.....	124



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Analisis hasil pengukuran diameter hambatan ekstrak metanol Spons BRLP-01 terhadap bakteri <i>Bacillus subtilis</i> dan <i>Escherichia coli</i> dengan metode Faktorial dilanjutkan dengan analisis uji lanjutan metode Duncan.....	87
2. Analisis hasil pengukuran diameter hambatan ekstrak metanol Spons BRLP-02 terhadap bakteri <i>Bacillus subtilis</i> dan <i>Escherichia coli</i> dengan metode Faktorial dilanjutkan dengan analisis uji lanjutan metode Duncan.....	92
3. Analisis hasil pengukuran diameter hambatan ekstrak metanol Spons BRLP-03 terhadap bakteri <i>Bacillus subtilis</i> dan <i>Escherichia coli</i> dengan metode Faktorial dilanjutkan dengan analisis uji lanjutan metode Duncan.....	97
4. Analisis hasil pengukuran diameter hambatan ekstrak metanol Spons BRLP-04 terhadap bakteri <i>Bacillus subtilis</i> dan <i>Escherichia coli</i> dengan metode Faktorial dilanjutkan dengan analisis uji lanjutan metode Duncan.....	102
5. Analisis hasil pengukuran diameter hambatan ekstrak metanol Spons BRLP-05 terhadap bakteri <i>Bacillus subtilis</i> dan <i>Escherichia coli</i> dengan metode Faktorial dilanjutkan dengan analisis uji lanjutan metode Duncan.....	107
6. Grafik hubungan antara konsentrasi (%) Ekstrak Metanol Spons BRLP-01 dengan diameter hambatan rata-rata pertumbuhan bakteri uji <i>Bacillus subtilis</i> dan <i>Escherichia coli</i>	112
7. Grafik hubungan antara konsentrasi (%) Ekstrak Metanol Spons BRLP-02 dengan diameter hambatan rata-rata pertumbuhan bakteri uji <i>Bacillus subtilis</i> dan <i>Escherichia coli</i>	113
8. Grafik hubungan antara konsentrasi (%) Ekstrak Metanol Spons BRLP-03 dengan diameter hambatan rata-rata pertumbuhan bakteri uji <i>Bacillus subtilis</i> dan <i>Escherichia coli</i>	114

9. Grafik hubungan antara konsentrasi (%) Ekstrak Metanol Spons BRLP-04 dengan diameter hambatan rata-rata pertumbuhan bakteri uji <i>Bacillus subtilis</i> dan <i>Escherichia coli</i>	115
10. Grafik hubungan antara konsentrasi (%) Ekstrak Metanol Spons BRLP-05 dengan diameter hambatan rata-rata pertumbuhan bakteri uji <i>Bacillus subtilis</i> dan <i>Escherichia coli</i>	116
11. Histogram Perbandingan Daya Hambat Pertumbuhan Bakteri uji tiap konsentrasi dengan Diameter Hambatan yang dibentuk oleh Ekstrak Metanol Spons BRLP-01.....	117
12. Histogram Perbandingan Daya Hambat Pertumbuhan Bakteri uji tiap konsentrasi dengan Diameter Hambatan yang dibentuk oleh Ekstrak Metanol Spons BRLP-02.....	118
13. Histogram Perbandingan Daya Hambat Pertumbuhan Bakteri uji tiap konsentrasi dengan Diameter Hambatan yang dibentuk oleh Ekstrak Metanol Spons BRLP-03.....	119
14. Histogram Perbandingan Daya Hambat Pertumbuhan Bakteri uji tiap konsentrasi dengan Diameter Hambatan yang dibentuk oleh Ekstrak Metanol Spons BRLP-04.....	120
15. Histogram Perbandingan Daya Hambat Pertumbuhan Bakteri uji tiap konsentrasi dengan Diameter Hambatan yang dibentuk oleh Ekstrak Metanol Spons BRLP-05.....	121

BAB I

PENDAHULUAN

Wilayah laut meliputi dua pertiga permukaan bumi, sekitar 25 sampai 30% terumbu karang dunia ada di wilayah Asia Tenggara dan sebagian besar terumbu karangnya terdapat di Indonesia dan Filipina. Terumbu karang di daerah tropis merupakan suatu ekosistem yang khas, mempunyai produktivitas organik yang sangat tinggi termasuk keanekaragaman biota laut yang hidup di dalamnya. Jenis biota laut yang terdapat di terumbu karang tersebut bisa dibandingkan dengan keanekaragaman hayati yang tumbuh di hutan tropis (1).

Indonesia dikenal sebagai negara bahari dengan luas 75% berupa lautan, memiliki kekayaan yang melimpah sumber daya hayati, antara lain ditemukan berbagai jenis spons. Beberapa jenis diantaranya dilaporkan memiliki senyawa bioaktif yang dapat digunakan dalam bidang farmasi (Ahmad *et al.*, 1995) (2).

Sama halnya di udara dan daratan, laut pun dihuni oleh bakteri yang tak terhitung jumlahnya dan banyak bakteri diantaranya bersifat patogen. Berbagai organisme mengembangkan mekanisme tertentu yang ampuh untuk melawan aktivitas bakteri patogen itu. Salah satu mekanisme umum adalah memproduksi senyawa-senyawa kimia yang lazim dikenal dengan senyawa antibiotika (3).

Besarnya potensi organisme laut membuat para ilmuwan dan produsen antibiotika dunia melirik laut sebagai sumber antibiotika potensial. Proyek perburuan antibiotika digelar dan ternyata hasilnya cukup menjanjikan, sebagai contoh, dari beberapa spesies rumput laut, telah berhasil diisolasi sejumlah

senyawa antibakteri yang belum pernah diketahui sebelumnya. Ini mungkin dapat menjawab kebutuhan dunia saat ini berupa antibiotika jenis baru karena antibiotika standar yang ada sekarang semakin berkurang efektivitasnya oleh karena, banyak bakteri patogen sudah mulai resisten terhadap antibiotika yang digunakan saat ini (3).

Berdasarkan uraian tersebut di atas, maka permasalahan yang ada yaitu apakah spons yang berasal dari Pulau Barrang Lompo, Sulawesi Selatan diduga memiliki potensi yang sangat besar sebagai sumber senyawa bioaktif yang selanjutnya dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku obat atau menjadi senyawa penuntun dalam sintesis obat baru. Oleh sebab itu perlu dilakukan penelitian tentang aktifitas senyawa bioaktif yang terkandung dalam spons yang diperoleh dari Pulau Barrang Lompo.

Pemanfaatan dan nilai ekonomis hewan spons laut dapat pula diterapkan untuk kemajuan dan pembangunan bangsa Indonesia, salah satu caranya adalah melalui kerjasama antara beberapa ilmuwan dari berbagai bidang seperti taksonomi, ekologi, fisiologi serta biokimia yang saling terkait dan berkaitan. Hal ini penting, karena spons bukanlah hewan yang telah siap pakai untuk mencapai nilai tumbuh tersebut. Hal lain yang juga sama pentingnya adalah bahwa, dalam pencarian senyawa-senyawa kimia baru tersebut bukan berarti untuk mengeksploitasi spons secara tidak bijaksana, tetapi hasil penemuan tersebut akan dipakai sebagai pola atau model untuk membuat senyawa sintetisnya (4).

BAB II

POLA PENELITIAN

II.1 Penyiapan Alat dan Bahan

II.1.1 Alat dan bahan disiapkan sesuai dengan keperluan

II.1.2 Sterilisasi alat dan bahan

II.1.3 Pembuatan medium

II.2 Penyiapan mikroba uji

II.2.1 Peremajaan kultur murni mikroba uji

II.2.3 Suspensi mikroba uji

II.3 Pembuatan Larutan Tetrasiklin HCl 30 ppm

II.4 Penyiapan bahan penelitian

II.4.1 Pengambilan Sampel

Sampel spons diambil dari perairan pantai Pulau Barrang Lompo, Sulawesi Selatan.

II.4.2 Pengolahan Sampel

Spons dibersihkan dan dicuci dengan air laut kemudian dimasukkan dalam toples dan direndam metanol.

II.5 Ekstraksi Spons

Spons dipotong kecil-kecil kemudian diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan metanol. Ekstrak metanol yang diperoleh kemudian diuapkan dan dipisahkan lebih lanjut dengan kloroform dan air dengan menggunakan corong pisah.

II.6 Pembuatan suspensi ekstrak metanol spons

Suspensi dibuat dengan cara melarutkan ekstrak metanol kental dalam air suling steril dengan konsentrasi 0,25 % ; 0,5 % ; 0,75 % ; 1,0 % ; 1,25 %(b/v).

II.7 Pengujian ekstrak

Ditentukan nilai Minimal Inhibitory Concentration (MIC) dari 5 konsentrasi larutan ekstrak metanol dalam medium NB (Nutrien Broth).

II.8 Pengujian Aktifitas Antimikroba

Pemeriksaan aktivitas antimikroba dilakukan dengan cara menginokulasikan mikroba uji pada media agar yang mengandung ekstrak metanol spons. Pengamatan dan pengukuran diameter daerah hambatan pertumbuhan dilakukan setelah diinkubasi pada suhu 37°C selama 1x24 jam menggunakan medium Glukosa Nutrien Agar (GNA).

II.9 Pendeteksian secara KLT-Bioautografi

II.9.1 Pemisahan secara Kromatografi Lapis Tipis

II.9.2 Pengujian secara Bioautografi

II.10 Pengumpulan data

II.11 Pembahasan Hasil Penelitian

II.12 Pengambilan Kesimpulan

B A B III

TINJAUAN PUSTAKA

III.1. Uraian Sampel Spons Laut

III.1.1 Morfologi Spons Laut (4,6,7,8,9)

Spons atau Porifera termasuk hewan multi sel yang mana fungsi jaringan dan organnya masih sangat sederhana. Hewan ini hidupnya menetap pada suatu habitat pasir, batu-batuan atau juga pada karang-karang mati di dalam laut. Dalam mencari makanan, hewan ini aktif mengisap dan menyaring air yang melalui seluruh permukaan tubuhnya.

Spons, yang banyak dikenal dengan nama bunga karang, merupakan organisme multiseluler yang termasuk dalam phylum Porifera. Porifera merupakan invertebrata paling rendah tingkatannya. Binatang ini belum memiliki susunan otot, daging maupun syaraf dan belum memiliki saluran pencernaan makanan maupun organ-organ tubuh lainnya. Spons tidak mempunyai organ tubuh dan anggota yang bergerak bebas (Hooper,1997).

Spons merupakan biota laut yang termasuk kedalam golongan invertebrata yang hidup pada ekosistem terumbu karang. Spons adalah nama umum sekelompok biota dari filum porifera dan merupakan hewan multiseluler yang paling sederhana, tidak memiliki organ maupun jaringan yang sebenarnya. Semua yang

termasuk filum ini menunjukkan pergerakan yang tidak dapat teramati.

Morfologi luar spons sangat dipengaruhi oleh faktor fisik, kimiawi dan biologis lingkungannya. Spesimen yang berada di lingkungan yang terbuka dan berombak besar cenderung pendek pertumbuhannya atau juga merambat. Sebaliknya specimen dari jenis yang sama pada lingkungan yang terlindung atau pada perairan yang lebih dalam dan berarus tenang, pertumbuhannya cenderung tegak dan tinggi. Pada perairan yang lebih dalam, spons cenderung memiliki bentuk tubuh yang lebih simetris dan lebih besar sebagai akibat dari lingkungan yang lebih stabil apabila dibandingkan dengan jenis yang sama yang hidup pada perairan yang dangkal. Pengamatan yang dilakukan oleh Amir (1992), menunjukkan bahwa spons pada jenis yang sama pertumbuhannya cenderung semakin besar dan meninggi dengan bertambahnya kedalaman laut.

Ciri-ciri dari spons ini mempunyai bentuk badan membulat atau merumpun pada aliran arus kuat dan lemah, umumnya membentuk percabangan. Spons yang umumnya hidup pada laut dalam umumnya berwarna putih, kuning dan hijau, ada sejumlah spesies yang berwarna hijau terang, kuning, orange, merah dan ungu yang merupakan keistimewaan dari air laut dangkal. Struktur spons umumnya terdiri atas flagella dan sel lengkung.

Semua spons hidup di air dan melekat pada batu, kerangka atau benda padat, beberapa diantaranya hidup diatas pasir halus dan dasar lumpur. Sebagian spesiesnya hidup dilaut mulai dari garis pasang sampai kedalaman 7,3 km. Spons hidup dengan memanfaatkan makanan disekelilingnya dengan cara mengisap dan menyaring, sehingga dikategorikan sebagai "Filter feeder". Spons mempunyai semacam perisai yang berupa susunan spikula yang berbentuk seperti duri atau jarum dengan ujung runcing. Spikula ini terbentuk dari senyawa silika dan kalsium karbonat. Spons memproduksi senyawa bioaktif hasil metabolisme sekunder yang bermanfaat dalam proses pencernaan secara enzimatik, terutama untuk mencerna bakteri sebagai sumber nutrisi baginya. Senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh spons tidak hanya bermanfaat untuk proses pencernaan makanannya, tetapi kandungan kimianya juga mampu menangkal dan menghambat pertumbuhan patogen pengganggu.

Menurut Kozloff (1990), spons dapat diklasifikasikan berdasar pada pengelompokan secara umum dan komponen rangka yang dimiliki, yaitu:

1. Kelas *Calcarea* atau *Calcispongiae*

Merupakan spons yang hidup didaerah pantai yang dangkal, bentuk tubuhnya sederhana. Spikula spons ini tersusun dari Kalsium Karbonat dan tidak mengandung spongin.

Sebagian besar spons dari kelas ini bentuknya kecil-kecil dan berwarna putih keabu-abuan, dan ada beberapa jenis berwarna kuning, merah jambu atau hijau. Elemen kerangka dari kelas *Calcarea* berbentuk spikula "triaxon" dan tidak ada perbedaan megasklera dan mikrosklera. Beberapa jenis spons ini adalah *Sycon gelatinosum* (berbentuk silinder berwarna coklat muda), *Clathrina* sp. dan *Leucetta* sp. Spons ini jumlahnya sedikit, lebih kurang hanya 10% dari jumlah semua hewan spons yang ada di laut. Terdiri dari 2 ordo, yaitu ordo *Asconosa* dan ordo *Syconosa*.

2. Kelas Hexactinellida atau Hyalospongiae

Merupakan spons yang hidup di daerah yang dalam dengan kedalaman 50 meter bahkan ada yang dapat tumbuh hingga 1 meter. Disebut juga spons gelas. Spikula terdiri dari silikat dan tidak mengandung spongin. Spikulanya berbentuk bidang "triaxon", dimana masing-masing bidang terdapat dua jari-jari (Hexactinal). Spons dari kelas ini belum banyak dikenal, karena sulit mendapatkan dan hanya terdapat di laut dalam. Contoh spons ini adalah *Euplectella* sp dan *Aspergillum* sp. Terdiri dari 2 ordo, yaitu ordo *Hexastrophora* dan ordo *Amphidiscophora*.

3. Kelas Demospongiae

Hampir 75% jenis spons yang dijumpai di laut adalah dari kelas Demospongiae. Spons dari kelas ini tidak memiliki spikula "triaxon" (spikula kelas Hexactinellidae), tetapi spikulanya berbentuk "monaxon", "teraxon" yang mengandung silikat. Beberapa jenis spons kelas ini ada yang tidak mengandung spikula tetapi hanya mengandung serat-serat kolagen atau spongin saja. Contohnya *Cliona* sp. dan *Spongia* sp.

Terdiri atas 8 ordo yaitu ordo *Carnosa*, ordo *Choristida*, ordo *Epipolasida*, ordo *Hadromerida*, ordo *Halicondrina*, ordo *Poeciloclerina*, ordo *Haploscerina*, ordo *Keratosa*.

III.1.2 Reproduksi Spons (4)

Pada umumnya hewan spons berkelamin ganda (hermaprodit), tetapi memproduksi sel telur dan sel spermanya pada waktu yang berbeda. Hewan ini dapat juga berkembang biak (reproduksi) secara aseksual (fragmentasi).

Bergquist (1978) melaporkan bahwa dalam reproduksi seksual, hewan ini membutuhkan pertemuan sperma dengan telur. Pejantan melepaskan spermanya melalui oskula, kemudian mengalir dan masuk ke dalam saluran masuk (ostia). Kemudian sperma tersebut ditangkap oleh "Choanocyte" dan bertemu dengan

telur dalam mesohil. Pada jenis spons yang ovipar, telur yang telah dibuahi dikeluarkan dari tubuh spons dan kemudian menetas. Sedangkan, pada jenis spons yang vivipar, larva spons dikeluarkan dari tubuh spons dan berenang dengan bulu getarnya selama selang waktu tertentu sapaı mendapat tempat menempel yang sesuai. Larva dari kelas Calcarea disebut "amphiblastula" sedangkan larva dari kelas Demospongia disebut "parenchymula". Setelah menempel, larva mengalami metamorfosa menjadi individu muda, disebut "olythus" pada Calcarea dan "rhagon" pada Demospongia. Pertumbuhan spons muda menjadi individu yang dewasa dipengaruhi oleh temperatur, salinitas, kekeruhan, arus air, kemiringan dasar, sediment serta kompetisi ruang (Bergquist & Tizard 1969).

Reproduksi aseksual umumnya dengan fragmentasi. Potongan-potongan dari spons yang patah dapat hidup dengan cadangan makanan yang ada ditubuhnya, kemudian bergenerasi membentuk tunas baru atau kompleks gemmula untuk menjadi spons dewasa (Bergquist 1978). Cara reproduksi fragmentasi ini dapat ditiru untuk membuat kultur spons.

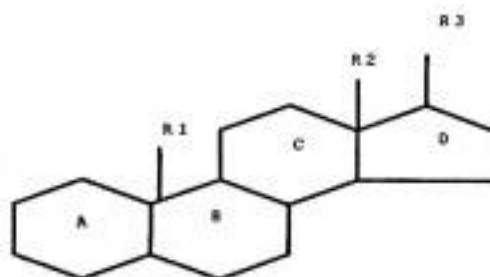
III.1.3 Kandungan Kimia Spons (4,8,10)

Spons diduga mengandung senyawa peptide, glikosida, saponin, steroid, amina, asam fenolik dan squalen serta turunannya yang dihasilkan dari metabolit sekunder.

Spons juga kaya akan senyawa kimia seperti karotin, asam amino bebas, sterol, asam lemak, brominat phenol, derivate senyawa dibromotyrosine dan bromopyrol (Bergquist & Hartman 1989, Bergquist 1978; Lawson *et al.*1984), serta senyawa kimia baru (Capon *et al.*1969) dan juga memiliki nilai yang penting untuk industri farmasi (Allen *et al.*1986). Hal ini disebabkan beberapa jenisnya memiliki sifat antibiotis yang tinggi.

Spons yang telah berhasil dipisahkan bioaktifnya mengandung sterol yaitu jenis sterol yang telah diidentifikasi dari spons seperti elionasterol, poriferasterol dan chondrillasterol (Lyoen & Bergmann 1942, Bergmann & Metique).

Senyawa kimia yang terdapat dalam spons yaitu steroid. Steroid merupakan produk yang dihasilkan melalui metabolit sekunder oleh hewan yang mana mempunyai kerangka dasar yaitu siklo pentano perhidro fenantren dengan rumus bangun sebagai berikut :



perbedaan jenis steroid ditentukan oleh jenis substituen R_1 , R_2 , R_3 . Struktur steroid yang terdapat dalam bahan alam laut berbeda dengan yang terdapat di darat.

Spons juga memiliki kandungan glikosida. Dimana glikosida merupakan senyawa organik, yang apabila dihidrolisa menghasilkan aglikon dan glikon dengan ikatan tertentu.

III.2 Metode Ekstraksi Bahan Alam (11,12)

III.2.1 Tujuan Ekstraksi

Tujuan ekstraksi adalah untuk menarik komponen kimia yang terdapat dalam bahan alam baik dari tumbuhan, hewan, dan biota laut dengan menggunakan pelarut organik tertentu. Proses ekstraksi ini didasarkan pada kemampuan pelarut organik untuk menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif, zat aktif akan larut dalam pelarut organik dan karena adanya perbedaan konsentrasi antara di dalam dan di luar sel, mengakibatkan terjadinya difusi pelarut organik yang mengandung zat aktif keluar sel. Proses ini berlangsung terus menerus sampai terjadi keseimbangan konsentrasi zat aktif di dalam dan di luar sel.

III.2.2 Jenis-jenis Ekstraksi Bahan Alam

Cara Ekstraksi atau penyarian bahan berkhasiat dari bahan alam (*simplicia*) pada dasarnya dibagi atas 2 bagian besar yaitu :

1. Cara dingin meliputi maserasi dan perkolasi
2. Cara panas meliputi refluks, sokhletasi, destilasi uap air

III.2.3 Ekstraksi Secara Maserasi

Metode maserasi merupakan metode yang paling sederhana, yang dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari selama beberapa hari pada temperatur kamar terlindung dari cahaya. Digunakan terutama untuk menyari simplisia yang mempunyai tekstur yang lunak dan tidak tahan pemanasan atau dengan pemanasan dapat menyebabkan kerusakan pada zat aktifnya dan juga yang mudah larut dalam cairan penyari, tidak mengandung benzoin, tiraks dan lilin.

Ekstraksi secara maserasi dilakukan dengan cara merendam simplisia dengan derajat halus tertentu sebanyak 10 bagian dalam bejana maserasi yang ditambahkan dengan 75 bagian cairan penyari. Ditutup dan dibiarkan selama 5 hari pada temperatur kamar terlindung dari cahaya sambil sesekali diaduk. Hasil maserasi yang diperoleh kemudian diserkai dan ampasnya ditambahkan lagi cairan penyari. Penyarian dianggap selesai apabila hasil identifikasi dengan kromatografi lapis tipis tidak menampakkan noda lagi.

Keuntungan cara penyarian dengan maserasi adalah cara pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana dan mudah diusahakan. Sedangkan kerugiannya adalah pengerjaannya lama dan penyariannya kurang sempurna.

Ada beberapa modifikasi metode maserasi, antara lain :

- a. Modifikasi digesti
- b. Modifikasi dengan menggunakan mesin pengaduk
- c. Remaserasi
- d. Maserasi melingkar

III.3 Metode Kromatografi (13,14)

Kromatografi adalah suatu teknik pemisahan, yang pertama kali dipakai untuk memisahkan zat-zat warna tanaman. Meskipun demikian pembatasan untuk senyawa-senyawa yang berwarna tak lama dan hampir kebanyakan pemisahan-pemisahan secara kromatografi sekarang diperuntukkan untuk senyawa-senyawa tak berwarna, termasuk gas.

Pemisahan secara kromatografi dilakukan dengan mengotak-atik langsung beberapa sifat fisika dari zat-zat yang menyusun suatu campuran atau molekul. Sifat-sifat fisika yang terlibat adalah :

1. Kecenderungan molekul untuk melarut dalam cairan
2. Kecenderungan molekul untuk melekat pada permukaan serbuk halus (adsorpsi, penyerapan)
3. Kecenderungan molekul untuk menguap atau berubah ke keadaan uap

Manfaat dilakukan kromatografi pada hakikatnya adalah dengan tujuan untuk mengetahui senyawa apa yang ada (kualitatif), berapa kadarnya (kuantitatif) dan bagaimana memperoleh komponen yang murni (preparatif).

Keuntungan-keuntungan dari teknik kromatografi antara lain merupakan metode pemisahan yang cepat dan mudah dan menggunakan peralatan yang murah dan sederhana (kecuali untuk kromatografi gas) hingga campuran yang kompleks dapat dipisahkan, hanya membutuhkan campuran cuplikan yang sangat sedikit, dan pekerjaan dapat diulang.

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

Cara pemisahan dengan adsorpsi pada lapisan tipis adsorben yang sekarang dikenal dengan kromatografi lapis tipis (Thin Layer Chromatography atau TLC) kini dapat digunakan untuk memisahkan berbagai senyawa seperti ion-ion organik, kompleks senyawa-senyawa organik dengan anorganik, dan senyawa-senyawa organik baik yang terdapat di alam dan senyawa-senyawa organik sintetik.

Sistem pelarut untuk KLT dapat dipilih dari pustaka, tetapi lebih sering kita mencoba-coba saja karena waktu yang diperlukan sebentar. Pemilihan sistem pelarut atas dasar *like dissolves like* berarti untuk memisahkan sampel yang bersifat nonpolar digunakan sistem pelarut nonpolar. Cuplikan untuk kromatografi ditotolkan sebagai larutan campuran yang akan dipisahkan, jumlah yang ditotolkan sekitar 5-100 μg setiap bercak. Penotolan dapat dilakukan dengan memakai pipa kapiler halus yang dibuat pipa kaca demikian rupa sehingga besarnya tidak jauh berbeda dengan peniti. Proses pengembangan akan lebih baik bila ruangan

pengembangan tersebut telah jenuh dengan uap sistem pelarut, dilakukan dengan cara meletakkan kertas filter pada dinding ruangan dengan dasar kertas tersebut tercelup pada sistem pelarutnya.

Visualisasi dimaksudkan untuk melihat komponen penyusun yang sudah terpisah setelah proses pengembangan. Proses visualisasi dapat bersifat destruktif dan nondestruktif. Visualisasi destruktif digunakan untuk KLT kualitatif dan kuantitatif sedangkan nondestruktif untuk KLT preparatif, kualitatif dan beberapa KLT kuantitatif. Cara-cara visualisasi antara lain dengan menggunakan uap iodin, sinar ultra violet, Asam sulfat pekat, dan pereaksi semprot lainnya.

Kromatografi lapis tipis adalah salah satu analisis yang digunakan untuk memisahkan senyawa secara cepat berdasarkan prinsip adsorpsi dan partisi. Adsorben berupa serbuk halus yang dilapiskan secara merata dan tipis (0,1 – 2 mm) diatas lempeng kaca sebagai fase diam dan pelarut pengembang sebagai fase gerak.

Kromatografi lapis tipis merupakan kromatografi adsorpsi dan adsorben bertindak sebagai fase stasioner. Empat macam adsorben yang umum dipakai adalah silika gel (asam silikat), alumina (aluminum oxyde), kieselguhr (diatomeous earth) dan selulosa. Dari keempat adsorben tersebut yang paling banyak

dipakai adalah senyawa silika gel dan masing-masing terdiri dari beberapa jenis yang mempunyai nama perdagangan bermacam-macam.

Karena adanya perbedaan daya serap adsorben terhadap senyawa, maka senyawa akan bergerak dalam kecepatan yang berbeda. Hal ini yang menyebabkan terjadinya pemisahan. Sistem yang paling sederhana ialah campuran pelarut organik yang dipakai untuk memisahkan molekul yang mempunyai satu dan dua gugus fungsi.

Nilai R_f (Retardation factor) merupakan parameter karakteristik kromatografi lapis tipis. Nilai ini merupakan ukuran kecepatan migrasi suatu senyawa pada kromatogram. Nilai R_f didefinisikan sebagai perbandingan antara jarak yang ditempuh senyawa dengan jarak yang ditempuh pelarut pengembang.

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh senyawa}}{\text{Jarak yang ditempuh pelarut pengembang}}$$

Beberapa faktor yang dapat mempengaruhi nilai R_f adalah :

- a. Struktur kimia dari senyawa yang dipisahkan
- b. Sifat dari penyerap (adsorben) dan derajat aktifitasnya
- c. Pelarut sebagai fase gerak dan derajat kemurniannya
- d. Kejenuhan dari uap dalam chamber



- e. Jumlah cuplikan yang digunakan
- f. Tebal dan kerataan dari lapisan penjerap
- g. Suhu
- h. Keseimbangan

III.4 Uraian Metode Bioautografi (16,17,18)

Bioautografi adalah metode pendeteksian untuk penemuan senyawa antimikroba yang belum teridentifikasi dengan melokalisir aktifitas antimikroba pada kromatogram, menurut Betina (1972).

Metode ini didasarkan pada efek biologi (antibakteri, antiprotozoa, antitumor, dll) dari suatu substansi yang diteliti. Dibandingkan dengan kromatografi kertas, kromatografi lapis tipis (KLT) mempunyai kekuatan pemisahan yang besar dan cepat dari kedua teknik tersebut. Ciri khas dari prosedur bioautografi adalah didasarkan atas teknik difusi agar dimana senyawa antibakteri dipindahkan dari lapisan kromatografi ke medium agar yang telah diinokulasi. Dua lapisan media Agar dianjurkan untuk bioautografi yaitu lapisan dasar (base layer) dan lapisan atas (seed layer). Zona inhibisi ditampakkan oleh aktifitas dehidrogenase dari pereaksi pendeteksi. Prosedur ini memiliki beberapa kekurangan kemudian diperbaiki dengan melakukan modifikasi tertentu.

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

Bioautografi dapat dibagi dalam 3 kelompok, yaitu : (Betina)

1. Bioautografi langsung

Dimana mikroorganisme tumbuh secara langsung di atas lempeng kromatografi lapis tipis.

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 dikeringkan secara hati-hati untuk menghilangkan sisa eluen. Senyawa dideteksi pada UV 254 nm dan 366 nm. Suspensi bakteri sebanyak 5-6 ml disebarakan di atas lempeng KLT (20 x 20 cm) menggunakan alat pemutar "roller" yang dilapisi dengan kertas kromatografi (Whatman Clipton). Lempeng KLT dinkubasi semalaman dalam kotak plastik dengan dilapisi kertas, kemudian disemprot dengan 5 ml larutan cair TTC (Trofonil Tetrazion Klorida) 20 mg/ml atau INT (5 mg/ml), INTB (5 mg/ml) serta MTT (2,5 mg/ml) dan diinkubasi kembali selama 4 jam pada suhu 37° C.

2. Bioautografi kontak

Dimana senyawa antimikroba dipindahkan dari lempeng KLT ke medium Agar yang telah diinokulasi melalui kontak langsung.

Prinsip kerja dari metode ini didasarkan atas difusi dari senyawa yang telah dipisahkan dengan kromatografi lapis tipis atau kromatografi kertas. Lempeng kromatografi ini ditempatkan di atas

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 tempat temperatur yang tepat hingga noda yang menghambat tampak pada permukaan. Zona ini dapat lebih jelas tampak dengan penggunaan indikator aktifitas dehidrogenase.

3. Bioautografi pencelupan

Dimana medium Agar telah diinokulasikan dengan suspensi bakteri dituang di atas lempeng KLT.

Prinsip metode ini adalah lempeng kromatografi yang telah dilusi diletakkan dalam cawan petri sehingga permukaan ditutupi oleh medium Agar yang berfungsi sebagai "base layer". Setelah medium Agar memadat, selanjutnya dituang medium Agar yang telah "layer", dan diinkubasi pada suhu dan waktu yang sesuai.

Beberapa modifikasi KLT bioautografi telah dilakukan oleh Nicholous dkk dengan menuangkan medium agar berisi 2, 3, 5- trifenil tetrazolium klorida (TTC) dan ditanami dengan mikroorganisme di atas kromatogram. Sedangkan Kline dan Golak menyemprotkan medium agar secukupnya pada lempeng KLT dan segera dipadatkan. Medium agar yang telah didinginkan pada suhu 48°C dan diinokulasi dengan organisme yang

diuji dituangkan langsung pada permukaan lempeng yang telah disiapkan. Zona inhibisi diidentifikasi setelah diinkubasi, dengan melihat langsung pada lempeng KLT yang tidak tembus cahaya. Bickel dkk menindihkan lempeng kromatografi pada permukaan medium agar pembedahan.

Beberapa prosedur yang dikembangkan 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 keterbatasan mikroorganisme yang dapat tumbuh secara langsung diatas lapisan kromatografi, ketersebaran bakteri diatas lempeng dan memungkinkan terjadinya kontaminasi. Sedangkan metode kromatografi pencelupan merupakan metode yang paling tepat sebab tidak dipengaruhi oleh kemungkinan adanya kontaminasi.

Pada bioautografi langsung dan bioautografi pencelupan, zona penghambatan dapat dilihat secara langsung pada lempeng KLT. Perbandingan kromatogram yang dilakukan pada kondisi yang sama dapat juga digunakan pada pereksi kromagenik yang sesuai dan memberikan informasi yang berguna tentang sifat alami dari bahan aktif.

III.5. Mekanisme Kerja Antimikroba (19,20,21,22)

Antimikroba adalah bahan-bahan atau obat-obat yang digunakan untuk memberantas infeksi mikroba pada manusia termasuk diantaranya antibiotika, antiseptika, kemoterapeutika, dan pengawet.

Antimikroba yang ideal menunjukkan toksisitas selektif, dimana obatnya lebih toksis terhadap mikroorganismenya dibandingkan pada sel hospes. Hal ini dapat terjadi karena pengaruh obat yang selektif terhadap mikroorganisme atau karena obat pada reaksi-reaksi biokimia penting dalam sel parasit lebih unggul pengaruhnya terhadap sel hospes. Disamping itu juga struktur sel mikroorganisme berbeda dengan struktur sel manusia (hospes, inang).

Dalam hal membasmi mikroba masih dikenal berbagai istilah lain, yaitu:

- a. Antibiotik adalah senyawa kimia yang dihasilkan oleh organisme hidup yang dalam kadar kecil mampu menghambat proses hidup mikroorganisme.
- b. Kemoterapeutik adalah senyawa kimia yang digunakan untuk membasmi mikroba dan biasanya digunakan secara sistemik.
- c. Antiseptik adalah zat kimia yang digunakan untuk membunuh atau menghambat pertumbuhan atau aktifitas mikroorganisme lain dengan cara menghambat atau membunuh dan biasanya digunakan pada jaringan hidup.

- d. Desinfektan adalah zat kimia yang digunakan untuk membunuh mikroorganisme patogen tapi tidak untuk spora bakteri dan digunakan untuk benda mati.
- e. Sanitizer adalah senyawa kimia yang digunakan untuk mengurangi jumlah mikroba yang mengkontaminasi ke suatu tingkat yang dinilai aman dan biasanya digunakan pada benda mati.

Mekanisme kerja utama antimikroba :

1. Antimikroba yang menghambat metabolisme sel mikroba

Mikroba membutuhkan asam folat untuk kelangsungan hidupnya, dimana bakteri patogen harus mensintesis sendiri asam folat dari asam para amino benzoat (PABA). Apabila suatu zat antimikroba menang bersaing dengan asam para amino benzoat (PABA) untuk diikutsertakan dalam pembentukan asam folat maka terbentuk analog asam folat yang non fungsional. Akibatnya kehidupan mikroba akan terganggu. Contoh obat yaitu : sulfonamide, trimetoprim, asam p-aminosalisilat (PAS) dan sulfon.

2. Penghambatan terhadap sintesis dinding sel

Dinding sel mikroba secara kimia adalah peptidoglikan yaitu suatu kompleks polimer mukopeptida (glikopeptida). Struktur dinding sel dapat dirusak dengan cara menghambat reaksi pembentukannya atau mengubahnya setelah dinding sel tersebut selesai dibentuk.

Antimikroba ini dapat menghambat sintesis atau menghambat aktivitas enzim seperti enzim transpeptidase yang dapat menimbulkan

kerusakan dinding sel yang berakibat sel mengalami lisis. Contohnya :
Basitrasin Sefalosporin, Sikloserin, Penisilin, Vankomisin.

3. Penghambatan terhadap fungsi membran sel

Membran sitoplasma mempertahankan bahan-bahan tertentu di dalam sel dan mengatur aliran keluar masuknya bahan-bahan lain. Membran sel memelihara integritas komponen-komponen seluler. Kerusakan pada membran ini akan mengakibatkan menghambatnya pertumbuhan sel atau matinya sel, akibatnya mikroba akan mati.

Jika fungsi integritas membran sitoplasma dirusak, makromolekul dan ion keluar dari sel, kemudian sel akan rusak. Dalam hal ini antimikroba dapat berinteraksi dengan sterol sitoplasma pada jamur, dan merusak membran sel bakteri Gram negatif. Contohnya : Amfoterisin β , kolistin, Imidasol, Triazol, Polien, Polimiksin.

4. Penghambatan terhadap sintesis Protein

Hidupnya suatu sel tergantung pada terpeliharanya molekul-molekul dalam keadaan alamiah. Suatu kondisi atau substansi mengubah keadaan ini yaitu mendenaturasikan protein dengan merusak sel tanpa dapat diperbaiki kembali. Suhu tinggi dan konsentrasi beberapa zat kimia dapat mengakibatkan koagulasi irreversibel komponen-komponen seluler yang vital ini.

Antimikroba mempengaruhi fungsi ribosom pada mikroorganisme yang menyebabkan sintesis protein terhambat. Dimana dapat berikatan dengan ribosom 30S yang dapat menyebabkan akumulasi sintesis protein awal yang kompleks, sehingga salah dalam menterjemahkan tanda mRNA dan menghasilkan polipeptida yang abnormal. Selain itu juga dapat berikatan dengan ribosom 50S yang dapat menghambat ikatan asam amino baru pada rantai peptida yang memanjang. Contohnya : Aminoglikosida, Kloramfenikol, Tetrasiklin, Eritromisin, Linkomisin.

5. Penghambatan terhadap sintesis asam nukleat

DNA dan RNA memegang peranan penting dalam proses kehidupan normal sel. Hal ini berarti bahwa gangguan apapun yang terjadi pada pembentukan atau pada fungsi zat-zat tersebut dapat mengakibatkan kerusakan total pada sel. Dalam hal ini mempengaruhi metabolisme asam nukleat, seperti berikatan dengan enzim DNA dependen RNA polymerase bakteri, memblokir helix DNA. Contohnya : Quinolon, Pyrimethamin, rifampin, sulfonamid, trimethoprim, trimetrexat.

III.6 Uraian Bakteri Uji yang Digunakan (23,24,25)

III.6.1 *Escherichia coli*

a. Klasifikasi

Divisio : Protophyta

Class : Schizomycetes

Ordo	: Eubacteriales
Family	: Enterobacteriaceae
Genus	: Escherichia
Spesies	: <i>Escherichia coli</i>

b. Sifat dan Morfologi

Escherichia coli adalah bakteri berbentuk batang lurus, berukuran $1,1 - 1,5 \mu\text{m} \times 2,0 - 6,0 \mu\text{m}$ terdapat dalam bentuk berpasangan atau tunggal, gram negatif, non motil, fakultatif anaerobik, dan kemoorganotropik. Memiliki metabolisme tipe fermentatif dan respirasi. Suhu optimum 37°C . tidak mempunyai spora dan kapsul, dapat meragikan dekstrosa, maltosa, dan laktosa dengan produksi asam dan gas. Mengandung enterotoksin dan faktor-faktor virulen, termasuk faktor perpindahan dan faktor kolonisasi, menyebabkan diare.

Bakteri ini tidak membentuk spora dan kapsul. Tumbuh dengan mudah pada medium nutrisi sederhana. Bersifat fakultatif anaerob, tumbuh dengan cepat dalam waktu 24 jam dengan suhu $20^{\circ}\text{C} - 40^{\circ}\text{C}$. Glukosa dan karbohidrat lainnya difermentasikan dengan menghasilkan piruvate, dimana ini akan dirubah menjadi asam laktat, asam asetat dan asam formiat. Kandungan G + C DNA ialah 50 sampai 51% mol.

III.6.2 *Bacillus subtilis*

a. Klasifikasi

Divisi	: Protophyta
Kelas	: Schizomycetes
Ordo	: Eubacteriales
Familia	: Bacillaceae
Genus	: Bacillus
Spesies	: <i>Bacillus subtilis</i>

b. Sifat dan Morfologi

Yang termasuk dalam genus bacillus adalah bakteri berbentuk batang besar, gram positif yang berbentuk rantai. Sel-sel berukuran $1 \times 3,4 \mu$, 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.

Bacillus subtilis berflagel peritritil, bergerak, endospora di tengah atau di ujung sporangium. Bila dipanasi dengan uap 100°C atau lebih selama kira-kira setengah jam akan tetap hidup. Tidak mampu mengadakan sporulasi pada pH rendah.

III.7 Uraian Umum Uji Mikrobiologis (20,26,27,28,29)

Dikenal beberapa cara pemeriksaan dan pengujian secara mikrobiologi terhadap kemampuan antimikroba dari bahan-bahan kemoterapeutika seperti antibiotika. Walaupun pada umumnya pengujian dilakukan terhadap kebanyakan antibiotika, namun ada juga bahan-bahan lain yang diduga mempunyai daya hambat atau membunuh mikroba.

III.7.1 Metode Pengenceran

Metode ini menggunakan antimikroba dengan kadar yang menurun secara bertahap, baik dengan media cair atau padat. Uji kepekaan cara dilusi cair dengan menggunakan tabung reaksi atau penetapan dengan cara turbidimetri. Potensi antimikroba dapat diketahui dengan melihat kekeruhan yang terjadi akibat dari pertumbuhan bakteri uji pada konsentrasi tertentu. Kemudian dibandingkan dengan kekeruhan yang terjadi pada zat anti mikroba pembanding yang mendapat perlakuan yang sama. Tetapi cara ini tidak praktis dan jarang dipakai.

Namun kini ada cara yang lebih sederhana dan banyak dipakai, yakni menggunakan *microdilution plate*. Keuntungan uji mikrodilusi cair adalah bahwa uji ini memberikan hasil kuantitatif yang menunjukkan jumlah antimikroba yang dibutuhkan untuk mematikan bakteri.

III.7.2 Metode Difusi

Metode difusi adalah proses perembesan larutan contoh pada medium. Pada metode ini kemampuan zat antimikroba ditentukan berdasarkan daerah hambatan yang dibentuk oleh larutan contoh terhadap pertumbuhan dari mikroba pada medium tersebut. Beberapa modifikasi dari metode ini adalah sebagai berikut :

a. Metode difusi dengan silinder pipih

Cara difusi dengan silinder pipih didasarkan atas perbandingan antara luas daerah hambatan yang dibentuk larutan contoh terhadap pertumbuhan mikroba dengan daerah hambatan yang terjadi oleh larutan pembanding, dimana silinder kecil dapat ditempatkan pada cawan petri yang berisi medium agar dengan sejumlah mikroorganisme uji, lalu silinder diisi dengan larutan sampel. Jika sampel tersebut efektif terhadap mikroorganisme uji, maka akan terbentuk daerah hambatan.

Pada cara ini digunakan plat silinder yang diletakkan pada media, kemudian larutan contoh dimasukkan ke dalamnya. Silinder yang digunakan besi tahan karat atau porselein dengan toleransi ukuran masing-masing lebih kurang 0,1 mm, diameter luar 8 mm, diameter dalam 6 mm dan tinggi 10 mm.

b. Cara difusi dengan mangkuk pipih

Prinsip dan cara kerja metode ini sama dengan silinder pipih. Perbedaannya adalah disini menggunakan alat berupa

"Cup Plate" yaitu lubang yang dibuat langsung pada medium agar.

c. Cara difusi dengan kertas saring

Perbedaan cara ini dengan cara-cara tersebut diatas adalah yaitu pada cara ini digunakan kertas saring yang dibuat dengan bentuk serta ukuran tertentu, biasanya berbentuk bulat dengan diameter 0,7 – 1,0 cm yang nantinya akan dicelup ke dalam larutan contoh (sampel) dan larutan pembanding. Pengamatan dilakukan setelah masa inkubasi dengan melihat daerah hambatan yang terbentuk.

d. Cara difusi Kirby-Bauer

Prinsip dan cara kerjanya sama dengan difusi dengan kertas saring. Perbedaannya adalah disini menggunakan alat untuk meletakkan kertas saring dan cawan petri yang digunakan berukuran 150 x 15 mm. Tinggi medium pada cawan petri adalah 5 – 6 mm, sehingga dapat dilakukan pengujian berbagai konsentrasi larutan contoh secara bersamaan. Setelah inkubasi, besarnya daerah hambatan dapat diukur dengan alat jangka sorong.

e. Cara difusi agar berlapis

Cara ini merupakan modifikasi cara Kirby Bauer. Perbedaannya yaitu pada cara ini menggunakan dua lapis agar, lapisan pertama tidak mengandung bakteri (base layer),

sedangkan pada lapisan keduanya menggunakan bakteri yang dicampur pada medium agar (seed layer).

III.8. Uraian Umum Tetrasiklin HCl (21,30)

- Rumus Kimia : 4-dimetilamino-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro-3,6,10,12,12a-pentahidroksi-6-metil-1,11, dioksinaftosen -2-karboksiamida hidroklorida
- Rumus Molekul : $C_{22}H_{22}N_2O_8$
- Berat Molekul : 480,91
- Pemerian : Serbuk halus, kuning, tidak berbau, stabil di udara tetapi pada pemaparan dengan cahaya matahari kuat menjadi gelap
- Kelarutan : Larut dalam 10 bagian air dan dalam 100 bagian *etanol* (95%)P; larutan dalam air jika dibiarkan menjadi keruh karena pengendapan tetrasiklina; praktis tidak larut dalam *kloroform* P; dalam *eter* P dan dalam *aseton* P; larut dalam larutan alkali hidroklorida dan dalam larutan alkali karbonat.
- Mekanisme Kerja : Golongan tetrasiklin menghambat sintesis protein bakteri pada ribosomnya. Paling sedikit terjadi 2 proses dalam masuknya antibiotik ke dalam ribosom bakteri gram-negatif, pertama yang disebut difusi pasif melalui kanal hidrofilik, ke dua ialah sistem transport aktif. Setelah masuk

maka antibiotik berikatan dengan ribosom 30S dan menghalangi masuknya kompleks tRNA-asam amino pada lokasi asam amino.

Efek antimikroba : Tetrasiklin termasuk antibiotik yang terutama bersifat bakteriostatik dan bekerja dengan jalan menghambat sintesis protein kuman.

Tetrasiklin memperlihatkan spectrum antibakteri luas yang meliputi kuman gram positif dan negatif, aerobik, dan anaerobik. Selain itu juga aktif terhadap spiroket, mycoplasma, riketsia, klamidia, legionela dan protozoa tertentu.

BAB IV
METODE PENELITIAN

IV.1 Penyiapan Alat dan Bahan

IV.1.1 Alat-alat yang digunakan

1. Batang pengaduk
2. Bejana Maserasi
3. Botol pengencer
4. Botol semprot
5. Cawan petri
6. Chamber
7. Corong
8. Corong pisah 500 ml
9. Gelas Kimia 250 ml (Pyrex)
10. Gelas Ukur 10,50 ml (Pyrex)
11. Inkubator
12. Jangka Sorong (Sunlon)
13. Kertas perkamen
14. Kompor Listrik
15. Labu Erlenmeyer 1000 ml (Pyrex)
16. Labu ukur 50,0 ml (Pyrex)
17. Laminar Air Flow
18. Lampu spiritus

19. Lampu UV 254 nm
20. Lempeng TLC 60 F₂₅₄ (E.Merck)
21. Otoklaf
22. Oven
23. Ose Bulat
24. Penangas air
25. Pinset
26. Pipa kapiler
27. Rak tabung
28. Rotavapor
29. Sendok tanduk
30. Sentrifuse
31. Spektrofotometer UV (Spectonik 340)
32. Tabung reaksi
33. Timbangan Analitik (Chyo)
34. Timbangan Kasar
35. Vial

IV.1.2 Bahan-bahan yang digunakan

1. Aluminium foil
2. Alkohol 70%
3. Agar
4. Air laut
5. Air suling

6. Biakan murni *Bacillus subtilis*
7. Biakan murni *Escherichia coli*
8. Dekstrosa (E.Merck)
9. Ekstrak daging (Pronadisa)
10. Ekstrak khamir
11. Ekstrak kentang
12. Glukosa
13. Kloroform
14. Larutan Asam sulfat (H_2SO_4) 2%
15. Larutan NaCl fisiologis 0,9% (Otsuka)
16. Metanol
17. Na-CMC 1%
18. Natrium Klorida (NaCl)
19. Pepton (Pronadisa)
20. Sampel Spons BRLP-01,BRLP-02,BRLP-03,BRLP-04,dan
BRLP-05
21. Spiritus
22. Tetrasiklin HCl 30 ppm (BPF)

IV.1.3 Sterilisasi alat (31,32,33)

Alat-alat gelas yang telah dipakai disterilkan dalam otoklaf pada tekanan 15 lbs (2 atm) pada suhu 121°C selama 20 menit, untuk menghindari mikroorganisme patogen. Setelah proses sterilisasi dibuang isinya, kemudian direndam dalam larutan

Na_3PO_4 1% dan dididihkan selama beberapa menit. Setelah dingin atau hangat alat-alat gelas disikat sampai bersih dan dibilas dengan air. Dicuci lagi dengan air sebersih mungkin kemudian dibilas dengan air suling. Dikeringkan dalam oven pada suhu 180°C selama 2 jam. Alat-alat plastik (yang tidak tahan pemanasan tinggi) disterilkan pada otoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C tekanan 2 atm. Jarum ose disterilkan dengan cara pemanasan langsung pada lampu spiritus selama 30 detik.

IV.1.4 Pembuatan medium (29,30,34)

1. Medium Nutrien Agar (NA)

Komposisi :

Ekstrak daging	3,0 g
Pepton	5,0 g
Agar	15,0 g
Air suling hingga	1000 ml

pH $7,0 \pm 0,2$

Cara pembuatan :

Semua bahan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer dan dilarutkan dalam air suling hingga volume 800 ml, selanjutnya diatur pH sampai 7,0 kemudian dicukupkan volumenya dengan air suling hingga 1000 ml. Disterilkan dalam otoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

2. Medium Nutrien Broth (NB)

Komposisi :

Ekstrak daging	3,0 g
Pepton	5,0 g
Air suling	1000 ml

pH 7,0

Cara membuat :

Bahan-bahan diatas, dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 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.

3. Medium Glukosa Nutrien Agar (GNA)

Komposisi :

Glukosa	10,0 g
Pepton	10,0 g
Ekstrak yeast	5,0 g
NaCl	2,5 g
Air suling hingga	1000 ml

pH 7,0 ± 0,2

Cara pembuatan :

Semua bahan kecuali glukosa dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan dilarutkan dalam air suling, kemudian dipanaskan sampai larut, selanjutnya diatur pH sampai 7,0 kemudian disterilkan dalam otoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Glukosa dilarutkan dalam air suling 200 ml dan diatur pH hingga 4,0 kemudian disterilkan dalam otoklaf pada suhu 110°C selama 40 menit. Setelah medium agak dingin dicampur dengan glukosa steril secara aseptis dan pH diatur hingga pH 7,0.

IV.2 Penyiapan mikroba uji**IV.2.1 Peremajaan kultur murni mikroba uji**

Bakteri uji berupa *Bacillus subtilis* dan *Escherichia coli* masing-masing diambil 1 ose kemudian diinokulasikan dengan cara digoreskan pada medium Nutrien agar (NA) miring selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

IV.2.2 Pembuatan Suspensi mikroba uji

Bakteri uji yang telah remaja disuspensikan dengan menggunakan larutan NaCl 0,9 % steril dengan menggunakan ose bulat kemudian diukur transmittannya pada 25 % menggunakan spektrofotometer, sebagai blanko digunakan larutan NaCl 0,9 % dengan panjang gelombang 580 nm.

IV.3. Pembuatan Larutan Tetrasiklin HCl 30 ppm

Dibuat larutan antibiotik Tetrasiklin HCl dengan larutan 30 ppm dengan cara menimbang Tetrasiklin HCl 100 mg dan dilarutkan dengan air suling steril sedikit demi sedikit kemudian dicukupkan volumenya hingga 100,0 ml di dalam labu takar. Dipipet 3 ml dan dicukupkan volumenya dengan air suling steril hingga 100,0 ml di dalam labu takar.

IV.4. Penyiapan bahan penelitian

IV.4.1 Pengambilan Sampel

Sampel yang digunakan berupa spons yang terdiri dari 5 jenis yaitu sampel dengan kode BRLP-01, BRLP-02, BRLP-03, BRLP-04 dan BRLP-05, yang diambil dari perairan pantai Pulau Barrang Lompo, Sulawesi Selatan.

IV.4.2 Pengolahan Sampel

Spons dibersihkan dan dicuci dengan air laut kemudian ditimbang sebanyak \pm 500 gram dan dimasukkan dalam toples selanjutnya direndam dengan metanol hingga sampel terendam semuanya selama transportasi.

IV.5 Ekstraksi Spons

Sampel spons yang berasal dari Pulau Barrang Lompo diawetkan dengan cara merendam langsung spons dalam metanol sebanyak 2 liter selama proses transportasi. Setelah sampai di laboratorium masing-masing sampel spons dikeluarkan dari metanol. Metanol yang digunakan untuk merendam selama proses transportasi diuapkan. Sampel spons dipotong

kecil-kecil dimasukkan dalam wadah maserasi. Ditambahkan metanol sebanyak 2 liter. Setelah 24 jam cairan penyaringnya diganti dengan metanol yang baru. Hal ini dilakukan sebanyak 3 kali dengan jumlah cairan penyari yang sama. Ekstrak metanol yang diperoleh selama proses pengawetan dan 3 kali proses penyarian kemudian diuapkan dengan menggunakan rotavapor kemudian dilanjutkan di atas penangas air sampai diperoleh ekstrak metanol kental. Ekstrak metanol kental selanjutnya dimasukkan dalam corong pisah dan ditambahkan kloroform dan air suling dengan perbandingan 1:1 dibiarkan hingga memisah. Lapisan air ditambahkan dengan metanol dan disentrifus. Supernatannya diambil sedangkan filtratnya berupa garam dibuang. Hal ini dilakukan beberapa kali hingga tidak terdapat lagi garam dalam sampel. Diuapkan hingga pelarutnya habis dan ditimbang. Berat ekstrak metanol yang diperoleh untuk masing-masing sampel yaitu untuk BRLP-01 11,6 gram; BRLP-02 10 gram; BRLP-03 12,95 gram; BRLP-04 2,39 gram, dan BRLP-05 10,8 gram.

IV.6 Pembuatan Suspensi ekstrak metanol spons

Larutan sampel dengan konsentrasi 0,25% b/v dibuat dengan cara ditimbang ekstrak kental sampel sebanyak 0,025 g lalu dilarutkan dengan 10 ml air suling steril. Untuk membuat konsentrasi sampel 0,5% b/v ; 0,75 % b/v; 1 % b/v dan 1,25% b/v dibuat dengan menimbang 0,05 g; 0,075g; 0,1 g; 0,125 g ekstrak kental sampel dan dilakukan cara yang sama seperti pada pembuatan konsentrasi 0,25% b/v.

IV.7 Pengujian ekstrak

IV.7.1 Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)

Medium NB (Nutrien Broth) steril dituang secara aseptis ke dalam tabung reaksi steril masing-masing sebanyak 5 ml dan ditambahkan 5 ml suspensi sampel dengan konsentrasi 0,5%, 0,75%, 1%, 1,25% dan 1,5% (b/v). Ditambahkan 0,02 ml mikroba uji *Bacillus subtilis* dan *Escherichia coli* yang telah diremajakan dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam dan diamati kekeruhan yang terbentuk untuk penentuan nilai KHM-nya & diperoleh nilai KHM yaitu pada konsentrasi 0,5%..

IV.7.2 Penentuan Daerah Hambatan

Diambil 5 konsentrasi yaitu 0,25%, 0,5%, 0,75%, 1% dan 1,25% b/v untuk pengukuran daerah hambatan. Kemudian dituang medium GNA (Glukosa Nutrien Agar) steril ke dalam cawan Petri sebanyak 15 ml dan dibiarkan membeku (base layer). Dituang medium GNA steril sebanyak 10 ml yang telah dicampur dengan suspensi bakteri uji ke dalam cawan petri yang sama dan dibiarkan setengah memadat (seed layer). Dimasukkan pencadang dengan diameter dalam 6 mm, diameter luar 8 mm dan tinggi 10 mm dan diatur jaraknya dari masing-masing pencadang. Tiap pencadang diisi dengan suspensi sampel dan digunakan tetrasiklin HCl 30 ppm sebagai kontrol positif. Diinkubasikan pada suhu 37°C

selama 1 x 24 jam pada inkubator. Diukur diameter zona hambatan yang terbentuk.

IV.8 Pengujian Aktivitas Antimikroba

Pemeriksaan aktivitas antimikroba dilakukan dengan cara menginokulasikan mikroba uji pada media agar yang mengandung ekstrak metanol spons. Pengamatan dan pengukuran diameter daerah hambatan pertumbuhan dilakukan setelah diinkubasi pada suhu 37°C selama 1x24 jam untuk bakteri menggunakan medium Glukosa Nutrien Agar (GNA).

IV.9 Pendeteksian secara KLT-Bioautografi

IV.9.1 Pemisahan secara Kromatografi Lapis Tipis

Ekstrak metanol sebanyak 100 mg dilarutkan dalam 10 ml cairan pengelusi yang digunakan. Ekstrak sampel tersebut ditotolkan pada lempeng TLC 60 F₂₅₄ dengan ukuran 8 x 2 cm menggunakan pipa kapiler. Ekstrak ditotolkan kira-kira 1 cm dari tepi bawah lempeng dan dibiarkan beberapa saat. Lalu dielusikan dengan eluen yang sesuai dalam chamber jenuh. Lempeng dibiarkan terelusi hingga 1 cm dari tepi atas lempeng. Lempeng dikeluarkan dari chamber dan diangin-anginkan hingga cairan pengelusnya menguap kemudian diamati di bawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm. Noda-noda yang memberikan fluoresensi diberi tanda pada lempeng.

IV.9.2 Pengujian secara KLT-Bioautografi

Medium Glukosa Nutrien Agar (GNA) steril yang telah didinginkan sebanyak 10 ml dituang ke dalam cawan petri steril dan dibiarkan memadat (base layer). Dituang medium GNA steril sebanyak 10 ml yang sudah dicampur dengan suspensi bakteri uji dan dibiarkan setengah memadat (seed layer). Lempeng KLT yang telah dicuci diletakkan di atas permukaan medium agar dan dibiarkan selama 30 menit dan lempeng tersebut diangkat dan dikeluarkan. Medium GNA kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 1x24 jam.

IV.10 Pengumpulan data

Data dikumpulkan dengan mengukur zona hambatan yang diberikan setelah diinkubasi selama 1x24 jam. Data yang diperoleh dianalisis secara Rancangan Analisis Faktorial dan metode Duncan.

IV.11 Pembahasan Hasil Penelitian

Pembahasan hasil penelitian diuraikan berdasarkan data yang diperoleh.

IV.12 Pengambilan Kesimpulan

Kesimpulan diambil berdasarkan data dan pembahasan hasil yang diperoleh.

BAB V

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

V.1 Hasil Penelitian

1. Hasil pengujian ekstrak metanol dengan metode dilusi

Konsentrasi terendah ekstrak metanol beberapa spons yang masih dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis* ATCC 6633 dan *Escherichia coli* ATCC 25923 adalah 0,5%.

2. Hasil pengujian ekstrak metanol dengan metode difusi

Pengujian dilakukan terhadap 5 konsentrasi yang berbeda dari tiap ekstrak metanol BRLP-01, BRLP-02, BRLP-03, BRLP-04, dan BRLP-05. Pada pengujian ini menggunakan pembanding Tetrasiklin HCl 30 ppm.

Dari hasil uji daya hambat ekstrak metanol dari 5 spons yang berbeda dengan menggunakan konsentrasi 0,25%; 0,5%; 0,75%; 1,0%; dan 1,25% pada bakteri *Bacillus subtilis* ATCC 6633 dan *Escherichia coli* ATCC 25923 diperoleh hasil diameter zona hambatan rata-rata terbesar sebagai berikut :

- a. Pada BRLP-01 untuk bakteri *Bacillus subtilis* ATCC 6633 dan *Escherichia coli* ATCC 25923 diperoleh diameter zona hambatan rata-rata terbesar yaitu 12,43 dan 11,83 pada konsentrasi 1,25% (lihat Tabel 1).
- b. Pada BRLP-02 untuk bakteri *Bacillus subtilis* ATCC 6633 diperoleh diameter zona hambatan rata-rata terbesar yaitu 12,58 pada

- Pada BRLP-02 menunjukkan adanya 4 noda dengan nilai Rf 0,23; 0,32; 0,84; dan 0,91 (Lihat Tabel 7).
- Pada BRLP-03 menunjukkan adanya 5 noda dengan nilai Rf 0,06; 0,21; 0,43; 0,78 dan 0,86 (Lihat Tabel 8)
- Pada BRLP-04 menunjukkan adanya 3 noda dengan nilai Rf 0,08; 0,72; dan 0,92 (lihat Tabel 9).
- Pada BRLP-05 menunjukkan adanya 3 noda dengan nilai Rf 0,04; 0,1; 0,74; dan 0,92 (lihat Tabel 10).

B. Analisa KLT-Bioautografi

Dari hasil KLT-Bioautografi pada ekstrak metanol dari 5 spons yang berbeda dengan menggunakan cairan pengelusi Eil asetat : Metanol : Air dengan perbandingan 5:2:1 diperoleh hasil :

- Pada BRLP-01 diperoleh 1 noda yang aktif dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji *Bacillus subtilis* ATCC 6633 yaitu dengan nilai Rf 0,05. Sedangkan pada bakteri uji *Escherichia coli* ATCC 25923 juga terdapat 1 noda yang aktif dengan nilai Rf 0,64 (lihat Tabel 11).
- Pada BRLP-02 diperoleh 2 noda yang aktif dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji *Bacillus subtilis* ATCC 6633 yaitu dengan nilai Rf 0,03 dan 0,91. Dan pada bakteri uji *Escherichia coli* ATCC 25923 terdapat 1 noda yang aktif dengan nilai Rf 0,91 (lihat Tabel 12).

kosentrasi 1,25% sedangkan *Escherichia coli* 12,83 pada kosentrasi 1,0% (lihat Tabel 2).

- c. Pada BRLP-03 untuk bakteri *Bacillus subtilis* ATCC 6633 dan *Escherichia coli* ATCC 25923 diperoleh diameter zona hambatan rata-rata terbesar yaitu 11,45 dan 16,55 pada kosentrasi 1,25% (lihat Tabel 3).
- d. Pada BRLP-04 untuk bakteri *Bacillus subtilis* ATCC 6633 dan *Escherichia coli* ATCC 25923 diperoleh diameter zona hambatan rata-rata terbesar yaitu 10,68 dan 13,88 pada kosentrasi 1,25% (lihat Tabel 4).
- e. Pada BRLP-05 untuk bakteri *Bacillus subtilis* ATCC 6633 dan *Escherichia coli* ATCC 25923 diperoleh diameter zona hambatan rata-rata terbesar yaitu 13,26 dan 12,43 pada kosentrasi 1,25% (lihat Tabel 5).

3. Hasil pemisahan secara KLT dan Pengujian secara KLT-Bioautografi

A. Hasil Pemisahan secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Pemisahan secara KLT ekstrak metanol dari 5 spons yang berbeda dengan menggunakan cairan pengelusi Etil asetat : Metanol : Air dengan perbandingan 5 : 2 : 1 setelah dilihat dengan penampak noda sinar UV 366 nm diperoleh hasil sebagai berikut :

- Pada BRLP-01 menunjukkan adanya 3 noda dengan nilai Rf 0,09; 0,64 dan 0,86 (lihat Tabel 6).

- Pada BRLP-03 diperoleh 3 noda yang aktif dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji *Bacillus subtilis* ATCC 6633 yaitu dengan nilai Rf 0,48; 0,78 dan 0,86. Dan pada bakteri uji *Escherichia coli* ATCC 25923 terdapat 2 noda yang aktif dengan nilai Rf 0,48 dan 0,86 (lihat Tabel 13).
- Pada BRLP-04 diperoleh 1 noda yang aktif dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji *Bacillus subtilis* ATCC 6633 dan *Escherichia coli* ATCC 25923 dengan nilai Rf 0,92 (lihat Tabel 14).
- Pada BRLP-05 diperoleh 1 noda yang aktif dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji *Bacillus subtilis* ATCC 6633 dan *Escherichia coli* ATCC 25923 dengan nilai Rf 0,92 (lihat Tabel 15).

V.2. Pembahasan

Penelitian dilakukan untuk mengetahui kemampuan antimikroba ekstrak metanol dari beberapa spons asal Pulau Barrang Lompo terhadap bakteri uji yang digunakan yaitu *Escherichia coli* ATCC 25923 dan *Bacillus subtilis* ATCC 6633 dengan menentukan daya hambatnya serta melakukan pemisahan senyawa yang memiliki aktivitas antimikroba secara KLT-Bioautografi. Dengan dilakukannya penelitian ini diharapkan dapat memperoleh adanya data ilmiah mengenai kemampuan antimikroba dari beberapa spons asal pulau Barrang Lompo sehingga nantinya dapat

dilakukan penelitian yang lebih lanjut mengenai spons yang mana pada saat ini banyak memberikan peluang-peluang baru di dunia farmasi.

Pada penelitian ini, spons yang diambil berasal dari Pulau Barrang Lompo yang mana ini mewakili dari beberapa pulau yang terdapat di Makassar. Spons yang digunakan dalam penelitian ini masih dalam bentuk kode BRLP hal ini untuk memudahkan dalam pengujian dan juga karena belum dilakukannya proses identifikasi dan juga isolasi yang lebih lanjut untuk mengetahui nama dan juga jenis dari spons. Dan juga kode BRLP digunakan karena memberikan simbol dari mana spons yang digunakan ini diambil.

Sampel spons dari pulau Barrang Lompo ini ada yang diambil di permukaan laut, di bagian dasar laut, juga di tengah laut dengan kedalaman yang berbeda-beda. Spons yang diambil memiliki warna yang berbeda-beda ada yang berwarna coklat muda, merah dan juga hijau dengan bentuk luar yang bervariasi yaitu ada yang berbentuk tabung, ada yang bercabang-cabang, semi bola. Konsistensi dari spons ini juga berbeda-beda yang mana kita harus meraba atau merasakan dengan tangan pada permukaan tubuh spons. Misalnya adanya rapuh, padat, lunak, keras, dan juga licin.

Tahap awal pengerjaan dari spons ini yaitu setelah diambil di pulau Barrang Lompo direndam dengan menggunakan cairan penyari metanol hal ini dilakukan untuk proses pengawetan agar tidak rusak selama proses transportasi berlangsung dan juga untuk menarik kandungan zat aktif dalam sel spons. Selanjutnya setelah sampai di tempat pengerjaan diganti dengan

cairan penyari metanol yang lain dan pada saat ini dilakukanlah proses ekstraksi spons secara maserasi. Ekstraksi secara maserasi dilakukan karena ekstraksi ini merupakan cara yang paling aman dan juga mudah untuk menyari simplisia yang mempunyai tekstur yang lunak dan tidak tahan pemanasan atau dengan pemanasan dapat menyebabkan kerusakan zat aktifnya (12).

Setelah dilakukannya proses maserasi selama 1 minggu selanjutnya dipisahkan komponen zat aktifnya dengan menggunakan corong pisah dengan menggunakan kloroform dan air suling dengan perbandingan 1 : 1. Ekstrak yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan menggunakan rotavapor.

Penelitian ini menggunakan 4 tahapan pengujian yaitu metode dilusi, metode difusi, Metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) yang dilanjutkan dengan metode KLT-Bioautografi. Pada pengujian beberapa sampel spons ini dilakukan dengan menggunakan 2 jenis bakteri uji yang mewakili bakteri gram positif yaitu *Bacillus subtilis* ATCC 6633 dan bakteri gram negatif yaitu *Escherichia coli* ATCC 25923. Strain ini umumnya digunakan dalam uji anti mikroba (5).

1. Pengujian Kosentrasi Hambatan Maksimum

Metode pengujian pertama yang dilakukan adalah metode dilusi atau pengenceran dengan menentukan konsentrasi hambatan minimum (KHM). Pada pengujian ini dilakukan dalam 5 kosentrasi yang berbeda yaitu 0,5%; 0,75%; 1%; 1,25% dan 1,5% (b/v) dengan

menggunakan medium Nutrien Broth (NB) untuk kedua bakteri uji yaitu *Bacillus subtilis* ATCC 6633 dan *Escherichia coli* ATCC 25923. Dari hasil pengujian diperoleh konsentrasi terkecil yang masih dapat menghambat pertumbuhan bakteri uji yaitu 0,5% dengan melihat perbandingan kekeruhan pada kelima konsentrasi yang dibuat.

2. Pengujian Daya Hambat Ekstrak Metanol Spons

Metode pengujian kedua yaitu metode difusi yang dilakukan untuk mengetahui besarnya zona hambatan yang dapat terbentuk dari sampel spons ini. Pengujian dilakukan dengan menggunakan 5 konsentrasi yang berbeda yaitu 0,25%; 0,5%; 0,75%; 1,0% dan 1,25% dimana dalam pengerjaannya dilakukan dengan menggunakan pencadangan yang memiliki ukuran diameter luar 8 mm, diameter dalam 6 mm dan tinggi 10 mm (29). Dari penelitian yang dilakukan dapat terlihat bahwa tiap spons memberikan hasil yang berbeda dalam menghambat bakteri uji yang digunakan apakah itu pada bakteri *Bacillus subtilis* ATCC 6633 maupun *Escherichia coli* ATCC 25923. Hasil dari metode difusi ini yaitu pada BRLP-01, BRLP-03 dan BRLP-05 pada *Bacillus subtilis* ATCC 6633 maupun *Escherichia coli* ATCC 25923 menunjukkan bahwa makin besar konsentrasi maka makin besar pula kemampuan bakteri uji dalam menghambat. Sedangkan BRLP-02 dan BRLP-04, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 menunjukkan hal yang sama akan tetapi pada *Escherichia coli* ATCC 25923 zona hambatan terbesarnya pada konsentrasi 1% untuk BRLP-02 sedangkan BRLP-04

pada konsentrasi 0,5% selanjutnya menurun kembali. Meningkatnya konsentrasi yang menyebabkan peningkatan zona hambatan dari spons mungkin disebabkan pula peningkatan senyawa aktif yang dapat menghambat kedua bakteri jika konsentrasinya ditingkatkan. Akan tetapi hasil yang diperoleh pada BRLP-4 mungkin disebabkan oleh kemampuan *Escherichia coli* ATCC 25923 untuk menghambat paling besar pada konsentrasi 0,5%. Zat bioaktif spons yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri antara lain peptida, glikosida, terpenoid, steroid, saponin, amina, asam fenolat, skualen serta turunannya yang dihasilkan dari proses metabolit sekunder spons tersebut (34).

Hasil yang diperoleh pada pengukuran diameter hambatan rata-rata terbesar yaitu pada BRLP-01 diperoleh diameter hambatan rata-rata terbesar untuk bakteri *Bacillus subtilis* ATCC 6633 dan *Escherichia coli* 25923 yaitu pada konsentrasi 1,25% dengan besar zona hambatan masing-masing yaitu 12,43 dan 11,83. Untuk BRLP-02, bakteri uji *Bacillus subtilis* ATCC 6633 diameter hambatan rata-rata terbesar pada konsentrasi 1,25% dengan nilai 12,58 sedangkan untuk *Escherichia coli* ATCC 25923 pada konsentrasi 0,5% dengan nilai 12,68. Pada BRLP-3 diperoleh diameter hambatan rata-rata terbesar untuk bakteri *Bacillus subtilis* ATCC 6633 dan *Escherichia coli*-25923 yaitu pada konsentrasi 1,25% dengan besar zona hambatan masing-masing yaitu 11,45 dan 16,55. Untuk BRLP-4, bakteri uji *Bacillus*

subtilis ATCC 6633 diameter hambatan rata-rata terbesar pada konsentrasi 1,25% dengan nilai 10,68 sedangkan untuk *Escherichia coli* ATCC 25923 pada konsentrasi 0,5% dengan nilai 15,02. Pada BRLP-5 diperoleh diameter hambatan rata-rata terbesar untuk bakteri *Bacillus subtilis* ATCC 6633 dan *Escherichia coli* 25923 yaitu pada konsentrasi 1,25% dengan besar zona hambatan masing-masing yaitu 13,26 dan 12,43.

Hasil pengukuran diameter daerah hambatan menunjukkan perbedaan perbedaan pada tiap-tiap konsentrasi. Hal ini disebabkan adanya perbedaan kandungan zat aktif. Peningkatan konsentrasi umumnya akan diikuti dengan peningkatan diameter hambatan zona yang terbentuk sebagaimana disebutkan dalam literatur bahwa konsentrasi, bahan kimia akan mempengaruhi mikroorganisme, dimana konsentrasi tertinggi akan menyebabkan lebih banyak kematian mikroorganisme. Akan tetapi daerah hambatan yang terjadi tidak selalu mengikuti aturan ini, karena beberapa faktor dapat mempengaruhi seperti laju pertumbuhan mikroorganisme, kemampuan dan laju difusi bahan aktif pada medium, kepekaan organisme terhadap zat aktif serta ketebalan dan viskositas medium (26).

Tetrasiklin HCl yang digunakan sebagai pembanding juga menunjukkan kemampuan menghambat dari sampel spons. Hal ini dilihat dari kemampuannya membentuk zona bening, akan tetapi tetrasiklin memiliki zona hambatan yang kecil dibandingkan dengan

ekstrak spons yang digunakan. Penggunaan Tetrasiklin HCl sebagai kontrol ataupun pembanding pada metode difusi juga KLT-Bioautografi dikarenakan Tetrasiklin HCl memperlihatkan spectrum antibakteri luas yang meliputi kuman gram positif dan negatif, aerobik, dan anaerobik (21).

Pengujian terhadap sampel spons selanjutnya dianalisis dengan menggunakan rancangan faktorial yang mana diperoleh hasil yang sangat signifikan berarti terdapat adanya pengaruh yang berbeda nyata untuk tiap konsentrasi dan juga untuk mikroba pada taraf 1% dan 5% dengan melihat bahwa $F_{hitung} > F_{tabel}$ untuk BRLP-01, BRLP-02, BRLP-03 dan juga pada BRLP-04. Sedangkan pada BRLP-05 terdapat adanya pengaruh yang berbeda pada tiap konsentrasi dimana $F_{hitung} > F_{tabel}$ akan tetapi untuk perbandingan antar mikroba diperoleh hasil yang tidak signifikan artinya tidak memperlihatkan perbedaan yang jauh antara kedua bakteri uji yang digunakan terhadap sampel spons yang digunakan.

Uji lanjutan dilakukan dengan menggunakan metode Duncan jika hasil analisis faktorialnya memberikan hasil yang signifikan. Dimana pada uji analisis antar konsentrasi untuk BRLP-01, BRLP-02, BRLP-03, BRLP-04 dan BRLP-05 dapat dilihat hubungan yang ada pada setiap konsentrasi. Hasil yang diperoleh ada yang signifikan dan juga non signifikan tergantung dari besarnya kemampuan dari bakteri uji dari tiap konsentrasi memberikan kemampuan anti mikroba pada taraf

1% dan 5%. Pada uji lanjutan dengan metode Duncan analisis antar mikroba untuk BRLP-01 menunjukkan hasil yang non signifikan, sedangkan untuk BRLP-02, BRLP-03 dan BRLP-04 menunjukkan hasilnya adalah signifikan. Adanya perbedaan ini kemungkinan disebabkan oleh perbedaan sensitifitas bakteri terhadap potensi suatu zat anti mikroba dimana terdapat perbedaan sifat fisiologi dan kimia tiap jenis bakteri. bakteri gram negatif mengandung lipid, lemak dalam persentase lebih tinggi dibandingkan dengan bakteri gram positif. Selain itu dinding sel gram negatif lebih tipis dari dinding sel bakteri gram positif. Dinding sel bakteri gram negatif mengandung peptidoglikan jauh lebih sedikit dan peptidoglikan ini mempunyai ikatan silang yang kurang ekstensif dibandingkan dengan dinding sel bakteri gram positif (24).

3. Pengujian Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Metode pengujian akhir dari penelitian ini adalah dilakukannya pemisahan senyawa dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Dimana KLT merupakan suatu metode yang paling cepat dan juga mudah dilakukan untuk mengetahui suatu senyawa berdasarkan prinsip adsorpsi dan partisi (14). Pada penelitian ini digunakan cairan pengelusi yang bersifat polar yaitu Etil asetat : Metanol : Air (5:2:1) dengan menggunakan penampak noda UV 366 nm yang diperoleh noda pada tiap sampel spons berbeda-beda. Pada BRLP-1 memperlihatkan adanya 3 noda yang berbentuk, untuk BRLP-2

terdapat 4 noda yang dihasilkan oleh cairan pengelusi, pada BRLP-3 dihasilkan 5 noda, BRLP-4 menghasilkan 3 noda dan BRLP-5 menghasilkan 4 noda. Noda-noda yang terbentuk memiliki nilai Rf dan juga warna yang berbeda-beda pula setelah dilihat pada penampakan noda UV 366 nm. Adanya noda yang dihasilkan pada pemisahan senyawa dengan menggunakan KLT disebabkan oleh daya elusi dari cairan pengelusi yang bervariasi sesuai dengan kepolaran cairan pengelusi. Noda tersebut merupakan komponen kimia non polar yang bersifat anti mikroba.

4. Pengujian KLT-Bioautografi

Setelah dilakukannya KLT kemudian dilanjutkan dengan metode KLT-Bioautografi. Dimana metode ini merupakan metode pendeteksian untuk penemuan senyawa antimikroba yang belum teridentifikasi dengan melokalisasi aktifitas antimikroba pada kromatogram. Bioautografi dapat dipertimbangkan paling efisien untuk mendeteksi komponen antimikroba sebab dapat melokalisasi aktifitas meskipun dalam senyawa kompleks dan dapat langsung diisolasi dari komponen yang aktif (16).

Pada pengujian senyawa anti mikroba dengan menggunakan metode KLT-Bioautografi, dipilih metode bioautografi kontak karena lebih mudah, sederhana dan paling sering digunakan. Hal ini juga didukung oleh penelitian Hamburger dan Cordell (1987), dengan bioautografi kontak diperoleh proses perpindahan senyawa aktif ke

dalam medium agar yang dapat menghasilkan zona hambatan yang lebih besar 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 zona hambatannya agak sukar diamati. Jadi dengan bioautografi kontak ketersebaran bakteri dapat dijamin serta zona hambatan dapat langsung diamati pada medium agar.

Hasil yang diperoleh setelah pengujian secara KLT-Bioautografi dengan menggunakan cairan pengelusi Etil asetat: Metanol : Air (5:2:1) yaitu pada BRLP-1 dari 3 noda yang dihasilkan oleh cairan pengelusi hanya 1 noda yang dapat memberikan aktifitas anti mikroba dari kedua bakteri uji *Bacillus subtilis* ATCC 6633 dan *Escherichia coli* 25923 masing-masing dengan nilai Rf 0,05 dan 0,64. Pada BRLP-2 dari 4 noda yang terbentuk hanya 2 noda yang dapat memberikan aktifitas anti mikroba untuk bakteri uji *Bacillus subtilis* ATCC 6633 dengan nilai Rf 0,03 dan 0,91 sedangkan untuk *Escherichia coli* ATCC 25923 terdapat 1 noda yang memberikan aktifitas anti mikroba. BRLP-3 dari 5 noda yang terbentuk hanya 3 noda yang dapat memberikan aktifitas anti mikroba untuk bakteri uji *Bacillus subtilis* ATCC 6633 dengan nilai Rf 0,48; 0,78 dan 0,86 sedangkan untuk *Escherichia coli* ATCC 25923 terdapat 2 noda yang memberikan aktifitas anti mikroba dengan nilai Rf 0,48 dan 0,86. Untuk BRLP-4

dari 3 noda yang dihasilkan oleh cairan pengelusi hanya 1 noda yang dapat memberikan aktifitas anti mikroba dari kedua bakteri uji *Bacillus subtilis* ATCC 6633 dan *Escherichia coli* 25923 dengan nilai Rf 0,92. Sedangkan untuk BRLP-5 dari 4 noda yang dihasilkan oleh cairan pengelusi hanya 1 noda yang dapat memberikan aktifitas anti mikroba dari kedua bakteri uji *Bacillus subtilis* ATCC 6633 dan *Escherichia coli* 25923 dengan nilai Rf 0,92.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

VI.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

1. Ekstrak Metanol dari kelima spons yang digunakan mempunyai efek anti mikroba terhadap bakteri uji *Bacillus subtilis* ATCC 6633 dan *Escherichia coli* ATCC 25923.
2. Hasil KLT-Bioautografi ekstrak metanol BRLP-3 memberikan aktivitas antimikroba yang paling baik dengan memberikan 3 noda yang aktif dari 5 noda yang tampak untuk kedua bakteri uji yang digunakan.

IV.2 Saran

1. Perlu dilakukan identifikasi spons tersebut yang mengandung senyawa aktif yang bersifat anti mikroba.
2. Disarankan menggunakan jenis bakteri yang lain dalam penelitian selanjutnya sehingga dapat dibandingkan hasil yang diperoleh
3. Perlu dilakukan penelitian mengenai efek-efek lain dari spons seperti antiinflamasi, antikanker, dan sebagainya.



DAFTAR PUSTAKA

1. Supriyono, Agus. 2000. *Isolasi dan Flusidasi Struktur Senyawa Hymenidin Dan Oroidin Dari Spons Axinella carteri Yang Berpotensi Sebagai Antibakteri.* Jurnal Sains dan Teknologi Indonesia 2000, Vol.2.No.2. Jakarta. 43-47
2. Rosmiati., & Suryati, Emma. 2001. *Isolasi, identifikasi dan pengaruh senyawa bioaktif spons (Callyspongia pseudoreticulata) terhadap bakteri patogen dari udang.* Jurnal Bioteknologi Pertanian. Vol.6.No.1. Balai Penelitian Perikanan Pantai, Maros, Indonesia. 16-21
3. Endarto, Joko. 2003. *Berburu Obat dari Laut.* Kompas, Jumat 14 Maret 2003
4. Amir, Ichsan., & Budiyanto, Agus. 1996. *Mengenal Spons Laut (Demospongiae) secara Umum.* Oseana, Volume XXI, Nomor 2. Penerbit LIPI, Jakarta. 15,30
5. Hamburger, M.O., dan Cordell, G.A. 1987. *Direct Bioautographic TLC Assay for Compounds Possesing Antibacterial activity.* J. Nat. Prod., Vol 50 no 1, 19-22
6. Astuti, Puji. 2003. *Spons, Invertebrata Laut Berpotensi Sebagai Sumber Bahan Obat Alam.* Volume 8, No.26 Oktober-Desember 2003 (Edisi Khusus). Bagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. 36-38
7. Bernes. R.D. 1980. *Invertebrate Zoologi.* Fourth Edition. Holt-Saunders International Edition. Gelysburg College. Pennsylvania. 104-106

8. Nybakken. J.W. 1993, *Marine Biology*. Third Edition. Harpes Collins Collage Publishing. New York. 432
9. Buss. L.W. 1976. *Better Living Through Chemistry*. The Realltionship between allelo-chemical Interactions and Competitive Networks. In Harriso. F.W. and R.R. Cowde (eds). *Aspects of Sponge Biology* Academic Press. New York.. 315-327
10. Stafford,B.1977. *Pharmaceutical Technology*. Fundamental Pharmacenties, Universitas of Iowa, Iowa.286
11. Harborne. J.B. 1987. *Metode Fitokimia, Penuntun Cara Modern Mengekstraksi Tumbuhan*. Edisi II. Penerbit ITB. Bandung. 13, 16
12. Ditjen POM. 1986. *Sediaan Galenik*. Edisi II . Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Bhakti Husada. Jakarta. 4-30
13. Adnan, M. 1997. *Teknik Kromatografi untuk Analisis Bahan Makanan*. Edisi Pertama. Cetakan Pertama. Penerbit ANDI. Yogyakarta. 2,9,14,17
14. Gritter, R.J., Bobbit, J.M., Schwarting, A.E. 1991. *Pengantar Kromatografi*. Edisi Kedua. Penerbit ITB. Bandung. 1,14,114,115
15. Ditjen POM. 1980. *Materi Medika Indonesia*. Jilid IV. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta. 144-147
16. Betina.V., 1972. *Pharmaceutical Application Of Thin Layer and Paper Chromatography*. Amsterdam. 503-507
17. Rahalison,L., Hostettmann. K. 1991. *A Bioautographic Agar Overlay Method For The detection Of Antifungal Compounds From Higher Plants*.

- Phytochemical Analysis, Vol. 2. University de Lausanne, Switzerland.
199-203
18. Rios, J.L. et al. 1988. *Screening Methods For Natural Products With Anti Microbial Activity*. Journal of Echinopharmacology. No. 23. departemen Farmacology. Faculted de Farmacia. Universide Complutenic de Madrid. Madrid. 122, 136-140, 144
19. Djide, M.N. 2003. *Mikrobiologi Farmasi*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Hasanuddin. Makassar. 84,87,88
20. Jawetz, Melnick, & Adelbergs's. 2001. *Mikrobiologi Kedokteran*. Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran. Universitas Airlangga. Salemba Medika. Jakarta. 224-228
21. Ganiswara, S. 1995. *Farmakologi dan Terapi*. Edisi IV. Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. 572, 573,651
22. Mycek, Mary J. 2001. *Farmakologi : Ulasan Bergambar*. Penerbit Widya Medika. Jakarta. 291
23. Smith, Conan, dan Overman. 1964. *Microbiology*. 13th Edition. Meredith Publishing Company. New York. 613,614,629
24. Pelczar, M.J. dan Chan, E.C.S. 1988. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Jilid II. Universtas Indonesia. Jakarta. 949,954,956
25. Buchanan, R.E. & Gibbons, N.E. 1974. *Bergey's Manual Of Determinative Bacteriology*. Eighth Edition. The Williams & Wilkins Company. Baltimore. USA. 293,319,340

26. Cappucino., James. G. Sherman. Natalie. 1987. *Microbiology: A Laboratory Manual*. The Benjamins/Publishing Company. Inc. Rockland Community College. State University of New York.53,57-67
27. Baker. F. 1987. *Handbook of Bacteriological Technique*. Second Edition. West Minessher Medical School. London. 67-75
28. Lay, B.W. 1994. *Analisis Mikroba Di Laboratorium*. PT. Raja Grafindo Persada, Jakarta. 70,71
29. Ditjen POM. 1995. *Farmakope Indonesia*. Edisi IV. Departemen Kesehatan RI. Jakarta. 26-28,891
30. Ditjen POM. 1979. *Farmakope Indonesia*. Edisi III. Departemen Kesehatan RI. Jakarta. 879
31. Jenkins.G. L. 1953. *Scoville's The Art of Compounding*. Edisi IX. Mc Graw Hill Book Company. Inc. New York . 203
32. Dwidjoseputro. D. 1980. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Djambatan. Malang. 11,37, 40, 44, 45
33. Cappucino., James. G. Sherman. Natalie. 1987. *Microbiology: A Laboratory Manual*. The Benjamins/Publishing Company. Inc. Rockland Community College. State University of New York.53,57-67
34. Difco.1988. *Culture Media Handbook*.E.Merck Darmastadii Federal Republik of Germany.124,52,131
35. Suryati.E., Ahmad.T. 1996. *Peluang Pemanfaatan Bioaktif Spons untuk Bakterisida*. Temu Ilmiah Veteriner. Maret. Bogor. 5-7