

**ISOLASI DAN SKRINING BAKTERI SIMBION DARI
BINTANG LAUT (*Protoreaster nodosus*) ASAL
PERAIRAN PANGKEP SEBAGAI PENGHASIL
ANTIBAKTERI TERHADAP *Escherichia coli***

**ISOLATION AND SCREENING OF SYMBIOTIC
BACTERIA FROM SEA STAR (*Protoreaster nodosus*)
FROM PANGKEP COAST AS ANTIBACTERIAL
PRODUCER AGAINST *Escherichia coli***

**CHRISTOPHER PETRA PURNOMO
N011191157**



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR**

2023

**ISOLASI DAN SKRINING BAKTERI SIMBION DARI
BINTANG LAUT (*Protoreaster nodosus*) ASAL
PERAIRAN PANGKEP SEBAGAI PENGHASIL
ANTIBAKTERI TERHADAP *Escherichia coli***

**ISOLATION AND SCREENING OF SYMBIOTIC
BACTERIA FROM SEA STAR (*Protoreaster nodosus*)
FROM PANGKEP COAST AS ANTIBACTERIAL
PRODUCER AGAINST *Escherichia coli***

**CHRISTOPHER PETRA PURNOMO
N011191157**



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR**

2023

**ISOLASI DAN SKRINING BAKTERI SIMBION DARI BINTANG LAUT
(*Protoreaster nodosus*) ASAL PERAIRAN PANGKEP SEBAGAI
PENGHASIL ANTIBAKTERI TERHADAP *Escherichia coli***

**ISOLATION AND SCREENING OF SYMBIONIC BACTERIA FROM SEA
STAR (*Protoreaster nodosus*) FROM PANGKEP COAST AS
ANTIBACTERIAL PRODUCER AGAINST *Escherichia coli***

SKRIPSI

Untuk melengkapi tugas-tugas dan memenuhi syarat-syarat
untuk mencapai gelar sarjana

CHRISTOPHER PETRA PURNOMO

N011191157

PROGRAM STUDI FARMASI

FAKULTAS FARMASI

UNIVERSITAS HASANUDDIN

MAKASSAR

2023

**ISOLASI DAN SKRINING BAKTERI SIMBION DARI BINTANG LAUT
(*Protoreaster nodosus*) ASAL PERAIRAN PANGKEP SEBAGAI
PENGHASIL ANTIBAKTERI TERHADAP *Escherichia coli***

CHRISTOPHER PETRA PURNOMO

UNIVERSITAS HASANUDDIN
N01191157

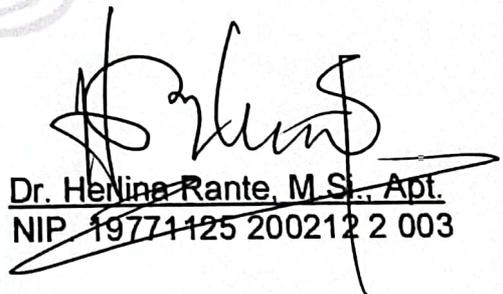
Disetujui oleh:

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping



Prof. Dr. Sartini, M.Si., Apt.
NIP. 19611111 198703 2 001



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

Pada tanggal 16 Juni 2023

SKRIPSI

**ISOLASI DAN SKRINING BAKTERI SIMBION DARI BINTANG LAUT
(*Protoreaster nodosus*) ASAL PERAIRAN PANGKEP SEBAGAI
PENGHASIL ANTIBAKTERI TERHADAP *Escherichia coli***

**ISOLATION AND SCREENING OF SYMBIONIC BACTERIA FROM SEA
STAR (*Protoreaster nodosus*) FROM PANGKEP COAST AS
ANTIBACTERIAL PRODUCER AGAINST *Escherichia coli***

Disusun dan diajukan oleh:

**CHRISTOPHER PETRA PURNOMO
N011191157**

telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin
pada tanggal 16 Juni 2023
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

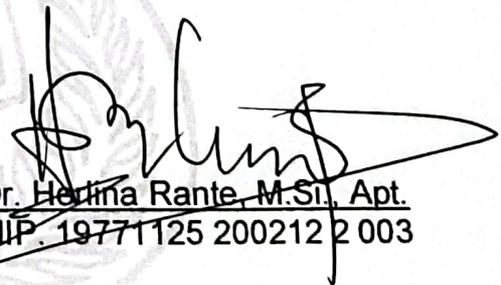
Menyetujui,

Pembimbing Utama

Pembimbing Pendamping

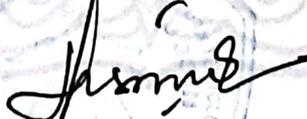


Prof. Dr. Sartini, M.Si., Apt.
NIP. 19611111 198703 2 001



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

Ketua Program Studi S1 Farmasi
Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin



Nurhasni Hasan, S.Si., M.Si., M.Pharm.Sc., Ph.D., Apt.
NIP. 19860116 201012 2 009

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Dengan ini saya menyatakan bahwa Skripsi ini benar-benar adalah hasil karya saya sendiri, tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kejarananaan di suatu Perguruan Tinggi, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa pernyataan saya ini tidak benar, maka skripsi dan gelar yang diperoleh batal demi hukum.

Makassar, 16 Juni 2023

Yang menyatakan,



Christopher Petra Purnomo
N011191157

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji dan syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa yang telah memberikan rahmat dan karunianya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan baik sebagai persyaratan untuk menyelesaikan studi dan mendapatkan gelar sarjana di Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin.

Penulis berharap agar skripsi ini tidak memiliki kekurangan, tetapi penulis menyadari bahwa pengetahuan penulis masih sangatlah terbatas, sehingga penulis banyak menerima bimbingan, petunjuk dan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Tuhan Yang Maha Esa, yang selalu menyertai dalam setiap langkah, atas karunia, akal, pikiran, kekuatan, kesehatan dan segala kemudahan-Nya dalam penyusunan skripsi ini.
2. Kedua orang tua, yaitu Alm. Bapak Raynold Trijanto Purnomo dan Ibu Ratna Liwang yang selalu memberikan motivasi dan nasihat, dan juga kakak penulis yaitu Tamara Geraldine Purnomo yang selalu memberikan saran dan masukan serta dukungan materil.
3. Ibu Prof. Dr. Sartini, M.Si., Apt. selaku pembimbing utama dan Ibu Dr. Herlina Rante, M.Si., Apt. selaku pembimbing pendamping yang telah meluangkan waktu dan tenaga untuk memberikan bimbingan serta arahan dalam penyusunan skripsi ini.

4. Bapak Abdul Rahim, S.Si., M.Si., PhD., Apt. dan Bapak Muhammad Nur Amir, S.Si., M.Si., Apt. selaku dosen penguji yang telah meluangkan waktunya dan memberikan masukan terkait penelitian ini dan dalam proses menyelesaikan skripsi ini.
5. Ibu Suhartina Hamzah, S.Si., M.Si., Apt. selaku pembimbing akademik yang telah membimbing selama proses menyelesaikan studi di Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin.
6. Korps. Asisten Mikrobiologi Farmasi, khususnya Micro Dexi yang senantiasa membantu dan memberikan dukungan kepada penulis.
7. Tim penelitian anak laut, finsyani, nadiyah, susan, dan aina yang selalu saling mendukung dan saling membantu, serta melewati suka dan duka bersama sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
8. Grup Seroja dan juga "Dexigen" yang telah membentuk kebersamaan selama ini baik di bangku perkuliahan maupun diluar perkuliahan sehingga terus memberikan semangat kepada penulis.
9. Semua pihak yang telah membantu yang tidak sempat disebutkan satu per satu.

Makassar, 16 Juni 2023



Christopher Petra Purnomo

ABSTRAK

CHRISTOPHER PETRA PURNOMO. Isolasi dan Skrining Bakteri Simbion Dari Bintang Laut (*Protoreaster nodosus*) Asal Perairan Pangkep Sebagai Penghasil Antibakteri Terhadap *Escherichia coli*

Escherichia coli merupakan bakteri Gram negatif yang menghasilkan suatu toksin yang dapat menyebabkan penyakit seperti diare maupun infeksi saluran kemih. Pengobatan yang dapat diberikan untuk mengatasi infeksi *Escherichia coli* adalah pemberian antibiotika. Penelitian saat ini telah banyak menggunakan metabolit dari bakteri simbion sebagai penghasil antimikroba yang salah satunya yaitu bakteri simbion bintang laut (*Protoreaster nodosus*). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah bakteri simbion *Protoreaster nodosus* dapat menghasilkan senyawa antibakteri terhadap *Escherichia coli* serta memiliki kandungan senyawa yang sama dengan inangnya. Proses isolasi bakteri simbion dilakukan dengan menggunakan medium *Marine Agar* yang dilanjutkan pada proses pemurnian menggunakan metode goresan kuadran. Pengujian antagonis menggunakan metode *agar block*, proses fermentasi menggunakan media cair *nutrient broth*, uji aktivitas antimikroba menggunakan metode difusi agar, identifikasi senyawa metabolit menggunakan KLT, identifikasi mikroorganisme dengan menggunakan uji aktivitas biokimia dan pengecatan Gram. Hasil isolasi menunjukkan terdapat 3 isolat yang diperoleh dengan kode BLP1, BLP2, BLP3. Pada kurva diameter hambat diperoleh isolat BLP2 memiliki diameter hambat tertinggi pada hari ketiga sehingga dilanjutkan pada proses fermentasi. Fermentasi Isolat BLP2 dilanjutkan pada pengujian aktivitas antimikroba dengan konsentrasi 2mg/disc dan 3mg/disc tidak menunjukkan diameter hambat, namun pada konsentrasi 4mg/disc menunjukkan diameter hambat untuk ekstrak bintang laut 9,13 mm dan fraksi etil fermentasi 10,03 mm. Dilakukan identifikasi isolat dengan pengujian aktivitas biokimia dan pengecatan Gram. Diperoleh hasil positif pada pengujian sitrat dan motilitas, serta isolat tergolong kedalam Gram negatif dan memiliki bentuk yang bulat. Pada identifikasi senyawa menggunakan kromatografi lapis tipis diperoleh beberapa senyawa yang memiliki nilai Rf yang menyerupai yaitu Rf 0,9 serta 0,4.

Kata kunci: Bakteri Simbion, *Protoreaster nodosus*, Aktivitas Antimikroba

ABSTRACT

CHRISTOPHER PETRA PURNOMO. Isolation and Screening of Symbiotic Bacteria from Sea Star (*Protoreaster nodosus*) from Pangkep Coast as Antibacterial Producer Against *Escherichia coli*

Escherichia coli is a Gram-negative bacteria that produces a toxin that can cause diseases such as diarrhea and urinary tract infections. The treatment that can be given to treat *Escherichia coli* infection is the administration of antibiotics. Current research has used many metabolites from symbiotic bacteria as antimicrobial producers, one of which is the starfish (*Protoreaster nodosus*) symbiotic bacteria. This study aims to determine whether the symbiotic *Protoreaster nodosus* can produce antibacterial compounds against *Escherichia coli* and has the same compound content as its host. The process of isolating the symbiotic bacteria was carried out using Marine Agar medium which was followed by a purification process using the quadrant scratch method. Antagonistic testing used the agar block method, the fermentation process used nutrient broth liquid media, antimicrobial activity test used the agar diffusion method, identification of metabolites using TLC, identification of microorganisms using biochemical activity tests and Gram staining. The isolation results showed that there were 3 isolates obtained with the codes BLP1, BLP2, BLP3. In the inhibition diameter curve, it was found that BLP2 isolate had the highest inhibition diameter on the third day so that it was continued in the fermentation process. Fermentation of BLP2 isolates was continued with antimicrobial activity testing with concentrations of 2mg/disc and 3mg/disc showing no inhibition diameter, but at a concentration of 4mg/disc showing an inhibition diameter of 9.13 mm for starfish extract and 10.03 mm of fermented ethyl fraction. Identification of isolates was carried out by testing biochemical activity and Gram staining. Positive results were obtained on citrate and motility tests, and the isolates were classified as Gram negative and had a round shape. In the identification of compounds using thin layer chromatography, it was found that several compounds had similar Rf values, namely Rf 0.9 and 0.4.

Key Word: Symbiotic Bacteria, *Protoreaster nodosus*, Antimicrobial Activity

DAFTAR ISI

	Halaman
UCAPAN TERIMA KASIH	vii
ABSTRAK	ix
ABSTRACT	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR SINGKATAN	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
BAB I PENDAHULUAN	1
I.1 Latar Belakang	1
I.2 Rumusan Masalah	4
I.3 Tujuan Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
II.1 Bintang Laut	5
II.2 Bakteri Uji	6
II.3 Antimikroba	9
II.4 Bakteri Simbion	12
II.5 Isolasi Mikroorganisme	12
II.6 Fase Pertumbuhan Bakteri	13
II.7 Fermentasi Mikroorganisme	14
II.8 Pengujian Aktivitas Antimikroba	15

II.9 Ekstraksi	17
II.10 Kromatografi Lapis Tipis	21
II.11 Identifikasi Mikroorganisme	22
BAB III METODE PENELITIAN	26
III.1 Alat dan Bahan	26
III.2 Metode Kerja	26
III.2.1 Penyiapan Alat dan Medium	26
III.2.2 Ekstraksi <i>Protoreaster nodosus</i>	29
III.2.3 Preparasi Sampel	29
III.2.4 Isolasi Bakteri Simbion	30
III.2.5 Pemurnian Bakteri Simbion	30
III.2.6 Uji Antagonis Isolat Bakteri Simbion	30
III.2.7 Fermentasi Isolat Bakteri Simbion	31
III.2.8 Uji Aktivitas Antimikroba	31
III.2.9 Uji Kualitatif Kromatografi Lapis Tipis	32
III.2.10 Uji Identifikasi Mikroorganisme	32
III.2.11 Pengumpulan Data, Analisis Data, dan Penarikan Kesimpulan	33
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	34
IV.1 Isolasi Bakteri Simbion	34
IV.2 Uji Antagonis	36
IV.3 Fermentasi Isolat	37
IV.4 Uji Aktivitas Antimikroba	39
IV.5 Uji Identifikasi Mikroorganisme	42

IV.6 Kromatografi Lapis Tipis	44
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	46
V.1 Kesimpulan	46
V.2 Saran	46
DAFTAR PUSTAKA	47
LAMPIRAN	50

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Morfologi Isolat Bakteri Simbion <i>P. nodosus</i> Secara Makroskopik	35
2. Pengukuran Diameter Hambat Isolat BLP2	42
3. Pengujian Aktivitas Biokimia dan Pengecatan Bakteri Simbion	42
4. Nilai Rf Spot Noda Pada Lempeng KLT	44
5. Hasil Pengujian Skrining Fitokimia Kromatografi Lapis Tipis	45

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. <i>Protoreaster nodosus</i>	6
2. <i>Escherichia coli</i>	9
3. Pengenceran Sampel Isolasi	34
4. Uji Antagonis Isolat	36
5. Grafik Hubungan Antara Diameter Zona Hambat dan Lama Fermentasi Bakteri Simbion Terhadap <i>Escherichia Coli</i>	38
6. Uji Aktivitas Antimikroba Konsentrasi 10%	41
7. Uji Aktivitas Antimikroba Konsentrasi 15%	41
8. Uji Aktivitas Antimikroba Konsentrasi 20%	41
9. Hasil Kromatografi Lapis Tipis	44
10. Skrining Fitokimia Kromatografi Lapis Tipis	45
11. Pengambilan Bintang Laut	55
12. Uji Hasil Fermentasi Hari ke-1	55
13. Uji Hasil Fermentasi Hari ke-3	55
14. Uji Hasil Fermentasi Hari ke-5	56
15. Uji Hasil Fermentasi Hari ke-6	56
16. Uji Sitrat	56
17. Uji Indol dan Motilitas	57
18. Uji Mr-VP	57
19. Pengecatan Gram	57
20. Pemurnian Isolat BLP3	58

21. Pemurnian Isolat BLP1	58
22. Pemurnian Isolat BLP2	59

DAFTAR SINGKATAN

<i>P. nodosus</i>	= Protoreaster nodosus
<i>E. coli</i>	= Escherichia coli
Rf	= Retardation factor
KLT	= Kromatografi Lapis Tipis
NA	= Nutrient Agar
MA	= Marine Agar
NB	= Nutrient Broth
SCA	= Simmon's Citrate Agar
SIM	= Sulfite Indole Motility
MR	= Methyl Red
VP	= Voges Proskauer
MHA	= Mueller Hinton Agar

DAFTAR LAMPIRAN

Tabel	Halaman
1. Skema Kerja Ekstraksi Bintang Laut	50
2. Skema Kerja Isolasi Bakteri Simbion	51
3. Skema Kerja Pemurian Bakteri Simbion	51
4. Skema Kerja Uji Antagonis Bakteri Simbion	52
5. Skema Kerja Fermentasi Isolat Bakteri Simbion	52
6. Skema Kerja Uji Aktivitas Antimikroba	53
7. Skema Kerja Uji Kualitatif Kromatografi Lapis Tipis	54
8. Dokumentasi Penelitian	55

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan suatu negara kepulauan yang sekitar 75% wilayah kedaulatannya merupakan laut, dimana terdiri atas 17.504 pulau dan luas wilayah perairan mencapai 5,8 juta km² (Setiyowati *et al*, 2016). Dengan luasnya wilayah perairan ini membuat keanekaragaman biota laut yang dimiliki perairan Indonesia sangat bervariasi sehingga disebut *mega diversity in the world*. Karena beragamnya biota laut yang dapat diperoleh di perairan Indonesia menyebabkan tingginya potensi sumber tersebut untuk dapat dimanfaatkan dalam berbagai bidang termasuk dalam bidang farmasi (Pratiwi, 2006).

Bintang laut merupakan salah satu biota laut yang dapat dimanfaatkan dalam bidang kesehatan karena dapat dijadikan sebagai sumber senyawa bioaktif yang memiliki aktivitas antibakteri (Masa *et al*, 2021). Bintang laut tergolong kedalam kelas *asteroida* dan filum *Echinodermata* ini memiliki komponen bioaktif berupa steroid, glikosida steroid, antrakuinon, alkaloid, fosfolipid, peptida, dan asam lemak (Thao *et al*, 2015). Bintang laut ini secara ekologi memiliki peran yang sangat penting dalam ekosistem laut karena bersifat pemakan deritus dan predator sehingga dalam ekosistem memiliki fungsi untuk merombak sisa bahan organik yang tidak terpakai oleh spesies lain. Karena pentingnya peran bintang laut pada ekosistem laut dan juga

adanya potensi dari bintang laut sebagai penghasil senyawa antibakteri sehingga apabila dilakukannya eksploitasi yang berlebih maka dapat menyebabkan dampak buruk bagi ekosistem laut (Nurafni, 2019).

Pada masa kini, permasalahan yang paling banyak dihadapi dalam dunia kesehatan adalah banyaknya bakteri yang resisten terhadap beberapa jenis antibiotika yang sudah lama digunakan seperti *Escherichia coli* (*E. coli*), sehingga untuk menghadapi permasalahan ini maka perlu adanya penelitian yang terus dilakukan terhadap bahan-bahan yang berpotensi untuk menghasilkan senyawa antibakteri seperti bintang laut (Piter, 2019).

Escherichia coli merupakan salah satu bakteri Gram negatif yang sering dijumpai dimana dapat menyebabkan infeksi saluran kemih (ISK) apabila terdapat pada saluran kemih (Klapaczynska *et al*, 2018). Selain dapat menyebabkan ISK pada inangnya, bakteri ini juga dapat menginfeksi pada saluran pencernaan dan menyebabkan diare pada inangnya yang dimana hal ini disebabkan oleh verotoksin yang dihasilkan. Bakteri ini tidak dapat dibunuh hanya dengan menggunakan suhu pendinginan, pembekuan atau pada suhu normal saja, melainkan hanya dapat dibunuh menggunakan antibiotika, sinar ultraviolet, atau menggunakan suhu tinggi $>100^{\circ}\text{C}$ (Sutiknowati, 2016).

Permasalahan banyaknya bakteri yang resisten terhadap antibiotika serta adanya dampak buruk apabila mengeksploitasi bintang laut sebagai salah satu penghasil antibiotika, maka hal ini dapat diatasi dengan menggunakan bakteri simbiosis dari bintang laut. Bakteri simbiosis adalah suatu

bakteri yang berasosiasi pada inangnya, yang dimana bakteri simbion ini mampu mensintesa metabolit sekunder yang identik maupun berbeda dengan organisme inangnya (Burgess *et al*, 2003). Dengan adanya penggunaan bakteri simbion ini, maka tidak lagi diperlukan bintang laut dalam jumlah yang banyak untuk diperoleh ekstrak yang dapat berfungsi sebagai antibakteri, sehingga dari hal ini dapat mencegah eksploitasi yang berlebihan dan mencegah rusaknya ekosistem laut (Madilana, 2018).

Berdasarkan hasil penelitian Hussain *et al* (2019) yang telah melakukan uji aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol bintang laut *Protoreaster linckii* asal pantai tenggara India terhadap bakteri uji *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*), dan *E.coli*, telah diperoleh rata-rata diameter hambat lebih besar dari 11 mm untuk *E.coli* dan lebih besar dari 0,9 mm untuk *S.aureus*.

Berdasarkan Fajri *et al* (2021) yang telah mengisolasi bakteri simbion dari *Protoreaster nodosus* (*P. nodosus*) asal pesisir Kabupaten Takalar, Sulawesi Selatan, metabolit sekunder yang diperoleh dari bakteri simbion *P. nodosus* memiliki aktivitas antibakteri yang baik terhadap bakteri *S.aureus*, *E.coli*, *Sallmonella* Thyposa, dan *Bacillus subtilis*, dimana untuk isolat yang diperoleh memiliki rata-rata diameter hambat lebih besar dari 11 mm.

Berdasarkan dari hasil penelitian yang telah dilakukan sebelumnya yang memperoleh isolat bakteri simbion dari *P. nodosus* asal pesisir takalar, maka penelitian ini dilakukan dengan mengambil sampel *P. nodosus* dari perairan pangkep untuk memperoleh isolat bakteri simbion yang dapat menghasilkan

antibakteri, hal ini didasari pada adanya perbedaan kondisi lingkungan seperti suhu, salinitas, pH, dan nutrisi yang dapat mempengaruhi seleksi mikroorganisme yang bersimbion dengan inangnya (Murniasih *et al*, 2018). Kondisi lingkungan takalar yang sebelumnya telah dilakukan penelitian *P.nodosus* memiliki suhu 26,8-28,96°C, salinitas 32,99-33,91 ppt, dan pH 7,54-7,65 (Ramdhan *et al*, 2018), sedangkan untuk kondisi lingkungan pangkep yang menjadi lokasi pengambilan sampel penelitian ini memiliki suhu 27,8-30,05°C, salinitas 28,6-34,51 ppt, dan pH 6,98-7,04 (Rusli, 2020).

I.2 Rumusan Masalah

1. Apakah bakteri simbiosis yang diperoleh dari *P. nodosus* menghasilkan senyawa antibakteri terhadap *E. coli* ?
2. Apakah hasil fermentasi bakteri simbiosis *P. nodosus* sebagai antibakteri memiliki metabolit sekunder yang sama dengan ekstrak *P. nodosus*?

I.3 Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui bahwa bakteri simbiosis yang diperoleh dari *P. nodosus* dapat menghasilkan senyawa antibakteri terhadap *E. coli*.
2. Untuk mengetahui perbandingan metabolit sekunder antara hasil fermentasi bakteri simbiosis *P. nodosus* sebagai antibakteri dengan ekstrak *P. nodosus*.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Bintang Laut (*Protoreaster nodosus*)

Bintang laut merupakan salah satu biota laut yang terdiri dari beberapa spesies yang hidup diperairan Indonesia. Salah satu yang sering dijumpai pada perairan Indonesia yaitu bintang laut bertanduk (*P. nodosus*). Biota laut ini memiliki kemampuan autotomi serta regenerasi bagian tubuh yang hilang, putus, ataupun rusak (Piter, 2019).

II.1.1 Ciri-ciri

Ciri-ciri dari *P. nodosus* yaitu memiliki lengan sebanyak 5 buah atau kelipatan dari lima, mulut terdapat di bawah yaitu di bagian oral sedangkan anus di bagian aboral, pergerakan dilakukan oleh kaki tabung yang terdapat berderet sepanjang lengannya, terdapat ambulakral groove diantara barisan kaki tabung, mempunyai beberapa macam warna seperti kuning, orange, dan keabu-abuan, serta bagian tubuh yang terdapat duri duri yang tumpul berwarna hitam (Piter, 2019).

II.1.2 Manfaat dan Kandungan

Bintang laut *P. nodosus* memiliki komponen bioaktif yang terdiri dari steroid, glikosida steroid, antrakuinon, alkaloid, fosfolipid, peptida, dan asam lemak (Thao *et al*, 2015). Dari senyawa aktif yang dimiliki oleh *P. nodosus* menyebabkan adanya beberapa aktivitas yang berguna bagi kesehatan seperti aktivitas antioksidan, antibakteri, antiinflamasi, antifungi, dan

imunostimulator (Piter, 2019).

II.1.3 Klasifikasi

Kingdom : Animalia
 Filum : Echinodermata
 Kelas : Asteroidea
 Ordo : Valvatida
 Famili : Ophidiasteridae
 Genus : *Protoreaster*
 Spesies : *Protoreaster nodosus* (Mbana, 2020).



Gambar 1. *Protoreaster nodosus*

II.2 Bakteri Uji (*Escherichia coli*)

Bakteri *E.coli* merupakan salah satu jenis yang sering dijumpai pada masyarakat. Pada umumnya, bakteri ini dapat ditemukan dalam usus besar manusia dan kebanyakan bakteri ini tidak berbahaya namun terdapat beberapa strain seperti *E. coli* tipe O157:H7 yang dapat menyebabkan keracunan makanan yang serius pada manusia yaitu diare berdarah yang disebabkan suatu toksin yang di produksi oleh *E.coli* yang bernama Verotoksin. Toksin ini bekerja dengan cara menghilangkan satu basa adenin dari unit 28S rRNA sehingga menghentikan sintesis protein (Sutiknowati, 2016).

II.2.1 Ciri-ciri

Ciri dari bakteri *E.coli* yaitu merupakan bakteri Gram negatif, tidak dapat dibunuh dengan pendinginan maupun pembekuan, dapat dibunuh

menggunakan antibiotika, sinar ultraviolet, atau suhu diatas 100°C (Suhu tinggi akan merusak protein dalam sel bakteri sehingga bakteri tidak dapat hidup lagi). *E. coli* ini memiliki bentuk basil/batang, tidak membentuk spora, tidak motil, memiliki panjang sekitar 2 mikrometer dan diameter 0,5 mikrometer, volumenya berkisar 0,6-0,7 m³, dapat hidup pada rentang suhu 20-40°C dengan suhu optimumnya pada 37°C (Sutiknowati, 2016).

II.2.2 Resistensi *E. coli*

Resistensi sel mikroba ialah suatu sifat tidak terganggunya kehidupan sel mikroorganisme oleh antimikroba. Sifat ini dapat merupakan suatu mekanisme alamiah untuk bertahan hidup. Mikroorganisme yang semula peka terhadap suatu antimikroba, dapat berubah sifat genetiknya menjadi tidak atau kurang peka. Secara umum mekanisme resistensi suatu mikroorganisme terhadap antimikroba terbagi menjadi beberapa yaitu perubahan tempat kerja (*target site*) obat pada mikroba, mikroba menurunkan permeabilitasnya sehingga obat sulit masuk ke dalam sel, inaktivasi obat oleh mikroba, mikroba membentuk jalan pintas untuk menghindari tahap yang dihambat oleh antimikroba, meningkatkan produksi enzim yang dihambat oleh antimikroba (Ganiswarna, 1995).

Salah satu metode yang dapat digunakan untuk membunuh bakteri *E. coli* adalah dengan pemberian antibiotika. Antibiotika yang sering digunakan dalam pengobatan infeksi bakteri ini yaitu ampisilin, akrbenisilin, sefalotin, kloramfenikol, gentamisin, kanamisin, asam nalidiksida, norfloksasin,

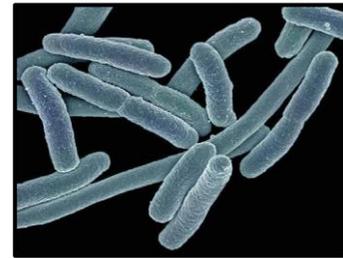
tetrasiklin, tikarsilin, tobramisin, dan trimetoprim-selfametoksasol (Normaliska *et al*, 2019). Pada pengobatan Infeksi Saluran Kemih (ISK) antibiotika yang sering digunakan adalah Cotrimoxazole[®], Fluoroquinolone, golongan β -Lactam seperti penicillin dan sefalosporin (Nurjanah, 2020).

Pada beberapa kondisi, *E.coli* dapat bermutasi yang menyebabkan kromosom mengkode produksi β -laktamase, sehingga mengakibatkan terjadinya produksi β -laktamase dalam jumlah yang sangat besar dalam waktu yang sangat singkat sehingga dapat menghidrolisis antimikroba bahkan yang stabil terhadap β -laktamase (Nurjanah, 2020).

Extended spectrum β -laktamase (ESBL) merupakan enzim yang terletak pada plasmid yang memiliki kemampuan untuk menghidrolisis (Melalui hidrolisis ikatan amida dari antibiotika) dan menyebabkan resistensi (Nurjanah *et al*, 2020), terhadap berbagai jenis antibiotika β -laktam, termasuk generasi ketiga broad-spectrum sefalosporin (misalnya, sefotaksim, seftriakson, dan seftazidim) dan monobaktam (misalnya aztreonam), tetapi tidak mampu mempengaruhi sefamisin (misalnya sefoksitin dan sefotetan) dan karbapenem (misalnya imipenem, meropenem, dan ertapenem), dan aktivitasnya dihambat oleh asam klavulanat. ESBL juga menyebabkan resistensi terhadap antibiotik aminoglikosida, penicilin, trimetoprim-sulfametoksasol, dan kuinolon (Normaliska, 2019).

II.2.3 Klasifikasi

Domain	: Bacteria
Kingdom	: Eubacteria
Filum	: Proteobacteria
Kelas	: Gammaproteobacteria
Ordo	: Enterobacteriales
Famili	: Enterobacteriaceae
Genus	: Escherichia
Spesies	: <i>Escherichia coli</i> (Sutiknowati, 2016)



Gambar 2. *Escherichia coli*

II.3 Antimikroba

Antimikroba merupakan suatu senyawa baik yang berasal dari biologis maupun kimia yang bersifat menghambat pertumbuhan dari suatu mikroorganisme seperti bakteri maupun fungi. Senyawa-senyawa yang terkhusus untuk menghambat atau mengganggu suatu pertumbuhan dari bakteri disebut sebagai antibakteri. Berdasarkan dari sifat toksisitasnya, antimikroba dapat dibagi menjadi 2 bagian yaitu, antimikroba yang bersifat membunuh mikroorganisme (bakterisidal) dan antimirkoba yang bersifat menghambat pertumbuhan bakteri (bakteriostatik). Dalam beberapa antibakteri, bakteriostatik dapat bersifat sebagai bakteriosidal apabila digunakan dalam konsentrasi yang tinggi (Purnamaningsih, 2017).

Adapun kategori kemampuan daya hambat suatu antimikroba dapat dibagi menjadi beberapa yaitu (Davis, 1971):

1. ≤ 5 mm = Lemah
2. 5-10 mm = Sedang
3. 10-20 mm = Kuat
4. ≥ 20 mm = Sangat kuat

II.3.1 Mekanisme Kerja Antimikroba

Suatu antimikroba dapat dibedakan menjadi beberapa bagian apabila ditinjau dari mekanisme kerja antimikroba tersebut, yaitu (Ganiswarna, 1995):

1. Antimikroba yang mengganggu metabolisme sel mikroba

Mikroorganisme membutuhkan asam folat untuk kelangsungan hidupnya. Berbeda dengan mamalia yang mendapatkan asam folat dari luar, mikroorganisme harus mensintesis sendiri asam folat dari asam para amino benzoat (PABA) untuk kebutuhan hidupnya. Apabila suatu antimikroba menang bersaing dengan PABA untuk diikutsertakan dalam pembentukan asam folat, maka terbentuk analog asam folat yang nonfungsional yang mengakibatkan kehidupan mikroorganisme akan terganggu

2. Antimikroba yang menghambat sintesis dinding sel mikroba

Dinding sel bakteri, terdiri dari polipeptidoglikan yaitu suatu kompleks polimer mukopeptida (glikopeptida). Antimikroba ini menghambat reaksi dalam proses sintesis dinding sel yang kemudian akan menyebabkan tekanan osmotik dalam sel mikroorganisme lebih tinggi daripada di luar sel maka kerusakan dinding sel mikroorganisme akan menyebabkan terjadinya

lisis.

3. Antimikroba yang mengganggu permeabilitas membran sel mikroba

Antimikroba ini dapat mempengaruhi permeabilitas selektif dan merusak membran sel dari mikroorganisme, sehingga karena kerusakan ini dapat menyebabkan keluarnya komponen penting dari sel suatu mikroorganisme seperti protein, asam nukleat, nukleotida dan lain-lain.

4. Antimikroba yang menghambat sintesis protein sel mikroba

Untuk kehidupannya, sel mikroorganisme perlu mensintesis berbagai protein. Sintesis protein berlangsung di ribosom dengan bantuan mRNA dan tRNA. Pada bakteri, ribosom terdiri atas dua sub unit, yang berdasarkan konstanta sedimentasi dinyatakan sebagai ribosom 30S dan 50S. Untuk berlunsi pada sintesis protein, kedua komponen ini akan bersatu pada pangkal rantai mRNA menjadi ribosom 70S. Penghambatan sintesis protein terjadi dengan berbagai cara seperti zat antimikroba yang berikatan dengan 30S dan menyebabkan kode pada mRNA yang salah dikenali oleh tRNA pada saat sintesis protein, dan zat antimikroba yang berikatan dengan ribosom 50S dan menghambat translokasi kompleks tRNA peptida dari lokasi asam amino ke lokasi peptida.

5. Antimikroba yang menghambat sintesis asam nukleat mikroba

Zat antimikroba ini akan berikatan dengan enzim polimerase-RNA (pada subunit) sehingga menghambat sintesis RNA dan DNA oleh enzim tersebut.

II.4 Bakteri Simbion

Bakteri simbion adalah suatu bakteri yang berasosiasi pada inangnya, yang dimana bakteri simbion ini mampu mensintesa metabolit sekunder yang identik maupun berbeda dengan organisme inangnya (Burgess *et al*, 2003). Senyawa aktif yang dihasilkan oleh suatu organisme inang dapat dimanfaatkan dengan mengisolasi bakteri simbiannya untuk mencegah terjadinya eksploitasi yang berlebihan (Madilana, 2018).

II.5 Isolasi Mikroorganisme

Pada suatu lingkungan/tumbuhan/hewan alami terdapat berbagai jenis mikroorganisme, sehingga dibutuhkan suatu pemisahan untuk mengetahui jenis, morfologi, maupun karakteristik mikroorganisme tersebut. Teknik pemisahan tersebut didefinisikan sebagai isolasi, atau dengan kata lain bahwa isolasi merupakan proses untuk mengambil suatu mikroorganisme dari lingkungan asalnya lalu menumbuhkannya di medium buatan. Proses lanjutan yang dapat dilakukan yaitu pemurnian yang bertujuan untuk memperoleh suatu mikroorganisme tertentu yang diinginkan tanpa tercemari oleh mikroorganisme lain (Sabbathini, 2017).

Metode yang dapat digunakan untuk melakukan proses isolasi umumnya terbagi menjadi 2 yaitu (Damayanti, 2020):

1. Metode Tuang

Metode ini adalah suatu teknik untuk menumbuhkan mikroorganisme di media agar dengan cara mencampurkan sampel dengan media yang masih

cair kemudian dihomogenkan agar mikroorganisme yang ingin diisolasi dapat tumbuh pada seluruh media.

2. Metode Sebar

Metode ini adalah suatu teknik untuk menumbuhkan mikroorganisme di media agar dengan cara menuangkan sampel keatas permukaan media yang telah memadat kemudian disebar agar mikroorganisme yang ingin diisolasi dapat tumbuh pada permukaan media.

II.6 Fase Pertumbuhan Bakteri

Fase pertumbuhan bakteri terbagi menjadi 4 fase yaitu (Risna, 2022):

1. Fase lag

Fase ini merupakan fase adaptasi ataupun kemampuan bakteri menyesuaikan diri dengan konsisi lingkungan baru. Kemampuan adaptasi bakteri pada fase lag sangat beragam yang dimana dapat dipengaruhi oleh komposisi media, jumlah sel pada inokulum awal, kondisi pH, suhu dan sifat fisiologis mikroba pada media sebelumnya. Fase lag juga disebut dengan fase awal ataupun fase penyesuaian aktivitas mikroba pada lingkungan baru. Fase lag biasanya berlangsung mulai dari beberapa menit hingga beberapa jam.

2. Fase eksponensial

Fase ini merupakan fase pertumbuhan yang kedua. Fase ini dibuktikan dengan terjadinya periode pertumbuhan yang sangat cepat. Pertumbuhan bakteri pada fase eksponensial dipengaruhi oleh kondisi suhu, pH, nutrient

dalam media dan sifat genetik mikroba. Fase eksponensial merupakan fase yang diperlukan mikroba untuk pembelahan sel atau penggandaan yang disebut dengan waktu generasi.

3. Fase stasioner

Fase ini merupakan ketika laju pertumbuhan sama dengan laju kematian mikroba, sehingga hasilnya jumlah mikroba tersebut secara keseluruhan akan tetap.

4. Fase kematian

Fase ini merupakan fase yang dapat dilihat dengan adanya peningkatan jumlah laju kematian yang melebihi jumlah laju pertumbuhan.

II.7 Fermentasi Mikroorganisme

Proses fermentasi merupakan suatu proses yang membantu memecah molekul organik besar melalui aksi mikroorganisme menjadi molekul yang lebih sederhana. Tindakan mikroba atau enzimatik pada suatu media cenderung memfermentasi yang mengarah ke perubahan biokimia yang diinginkan sehingga dapat menghasilkan suatu senyawa yang salah satunya dapat digunakan sebagai senyawa antimikroba (Sharma *et al*, 2020). Beberapa faktor yang umumnya dapat mempengaruhi proses fermentasi dalam menghasilkan suatu senyawa adalah substrat (medium), pH (keasaman), suhu pada proses fermentasi, kadar oksigen, serta waktu yang dibutuhkan untuk mendapatkan metabolit yang diinginkan (Kusuma, 2020).

Secara umum, terdapat beberapa metode yang dapat digunakan untuk melakukan proses fermentasi yaitu (Maftukhah, 2020):

1. Fermentasi Padat

Fermentasi dengan metode ini merupakan suatu proses fermentasi yang sangat berpotensi untuk produksi enzim. Hal ini dapat menjadi perhatian khusus karena produk fermentasi mentah dapat digunakan secara langsung sebagai sumber enzim. Proses dari fermentasi ini menggunakan bantuan/substrat yang berbentuk padatan. Kelebihan metode ini yaitu produktivitas fermentasi yang lebih tinggi, konsentrasi produk dan stabilitas yang lebih tinggi, penanaman mikroorganisme khusus untuk substrat yang tidak larut.

2. Fermentasi Cair

Fermentasi cair adalah suatu metode fermentasi yang menggunakan perantara media cair dalam pembentukan suatu produk metabolit. Sistem fermentasi cair ini memiliki kelebihan dikarenakan mudahnya untuk merencanakan kontrol proses dan sterilisasi. Selain itu, produksi enzim dapat bersifat konstitutif atau diinduksi dan menunjukkan pola produksi yang berbeda, tergantung pada strain dan kondisi kultur.

II.8 Pengujian Aktivitas Antimikroba

Pengujian aktivitas antimikroba adalah pengujian yang dilakukan untuk mengetahui kemampuan suatu senyawa antimikroba untuk menghambat atau membunuh suatu mikroorganisme yang diuji (Nurhayati, 2020).

Terdapat beberapa metode yang dapat dilakukan untuk melakukan pengujian aktivitas antimikroba, yaitu:

1. Metode Difusi

Prinsip kerja dari metode ini yaitu terdifusinya senyawa antibakteri ke dalam media padat dimana mikroba uji telah diinokulasikan. Hasil yang diperoleh berupa ada atau tidaknya zona bening yang terbentuk di sekeliling reservoir yang menunjukkan zona hambat pada pertumbuhan bakteri. Metode difusi pada umumnya terbagi menjadi 3 bentuk pengerjaan yaitu metode dengan menggunakan lempeng silinder, sumuran, dan kertas cakram (Balouiri, 2016).

- a. Metode Lempeng Silinder

Metode ini dilakukan dengan menempatkan sebuah lempeng silinder ke agar yang hampir memadat yang telah diinokulasi dengan bakteri uji. Lempeng silinder yang telah ditempatkan kemudian diisi dengan sampel yang akan diuji. Setelah dilakukan inkubasi, pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat ada tidaknya zona bening disekitar lempeng silinder (Nurhayati, 2020).

- b. Metode Sumuran

Metode ini dilakukan dengan membuat lubang yang dibuat tegak lurus menggunakan *cork borer* pada agar padat yang telah diinokulasi dengan bakteri uji. Lubang yang telah dibuat kemudian diisi dengan sampel yang akan diuji. Setelah dilakukan inkubasi, pertumbuhan

bakteri diamati untuk melihat ada tidaknya zona bening disekitar lubang (Nurhayati, 2020).

c. Metode Kertas Cakram

Metode ini dilakukan dengan mencuplik sampel yang akan diuji ke kertas cakram yang berfungsi sebagai mediator untuk menyerap bahan antimikroba. Kertas cakram kemudian diletakkan keatas agar padat yang telah diinokulasi bakteri uji. Setelah dilakukan inkubasi, pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat ada tidaknya zona bening disekitar kertas cakram (Nurhayati, 2020).

2. Metode Dilusi

Metode dilusi adalah salah satu metode pada pengujian aktivitas mikroorganisme yang menggunakan media cair. Metode ini digunakan untuk mengetahui potensi suatu senyawa terhadap aktivitas mikroba dengan menentukan Konsentrasi Hambat Minimal (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM) dari suatu senyawa antimikroba (Fatisa, 2013).

II.9 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan suatu langkah pertama untuk memisahkan produk alami yang diinginkan dari bahan mentah sehingga dapat diperoleh suatu senyawa dari bahan tersebut. Ekstraksi produk alami berlangsung melalui beberapa tahapan yaitu pelarut menembus ke dalam matriks padat, lalu zat terlarut larut dalam pelarut, setelah itu zat terlarut terdifusi keluar dari matriks padat, dan zat terlarut yang diekstraksi dikumpulkan (Zhang, 2018).

Ekstraksi secara umum terbagi atas ekstraksi padat-cair dan ekstraksi cair-cair. Ekstraksi padat-cair merupakan suatu proses transfer secara difusi analit dari sampel yang berbentuk padat ke dalam pelarutnya, sedangkan ekstraksi cair-cair adalah suatu metode pemisahan yang didasarkan fenomena distribusi atau partisi suatu analit diantara dua pelarut yang tidak saling bercampur, ekstraksi ini biasanya digunakan untuk mendapatkan suatu senyawa dari campuran berfase cair dengan pelarut yang juga berfase cair (Leba, 2017).

Metode ekstraksi secara umum terbagi menjadi konvensional yang meliputi maserasi, perkolasi, sokletasi, dan ekstraksi refluks biasanya menggunakan pelarut organik dan membutuhkan volume pelarut yang besar serta waktu ekstraksi yang lama. Beberapa metode ekstraksi modern atau lebih ramah lingkungan seperti ekstraksi fluida super kritis (SFC), ekstraksi cair bertekanan (PLE), dan ekstraksi dengan bantuan gelombang ultrasonik (UAE) (Zhang, 2018).

II.9.1 Maserasi

Maserasi adalah suatu metode ekstraksi dengan cara merendam sampel dalam rentang waktu tertentu. Ini adalah metode ekstraksi yang sangat sederhana dengan kelemahan waktu ekstraksi yang lama dan efisiensi ekstraksi yang rendah. Metode ini dapat digunakan untuk ekstraksi komponen termolabil atau tidak tahan terhadap pemanasan (Zhang, 2018).

II.9.2 Perkolasi

Perkolasi adalah suatu metode ekstraksi yang dimana sampel teralirakan oleh pelarut yang berfungsi menarik senyawa yang berada dalam sel. Perkolasi lebih efisien daripada maserasi karena merupakan proses berkelanjutan dimana pelarut jenuh secara konstan digantikan oleh pelarut baru, namun metode ini juga memerlukan waktu penyarian yang cukup lama (Zhang, 2018).

II.9.3 Refluks

Metode ekstraksi refluks merupakan metode dimana sampel akan dimasukkan ke dalam labu alas bulat yang kemudian dipanaskan bersama dengan cairan penyari. Metode ini merupakan metode yang lebih efisien daripada perkolasi atau maserasi dan membutuhkan lebih sedikit waktu ekstraksi dan pelarut. Kekurangan dari metode ini yaitu tidak dapat digunakan untuk ekstraksi produk alami termolabil atau yang tidak tahan terhadap pemanasan (Zhang, 2018).

II.9.5 Sokletasi

Metode ekstraksi soxhlet merupakan metode yang mengintegrasikan keuntungan dari ekstraksi refluks dan perkolasi, yang memanfaatkan prinsip refluks dan siphoning untuk terus mengekstrak sampel dengan pelarut segar. Metode ekstraksi ini merupakan ekstraksi kontinu otomatis dengan efisiensi ekstraksi tinggi yang membutuhkan lebih sedikit waktu dan konsumsi pelarut daripada maserasi atau perkolasi. Suhu tinggi dan waktu ekstraksi dalam

metode ini dapat meningkatkan kemungkinan degradasi termal (Zhang, 2018).

II.9.6 Fluida Super Kritis

Ekstraksi cairan superkritis (SFE) merupakan metode ekstraksi yang menggunakan cairan superkritis (SF) sebagai pelarut ekstraksi. Cairan ini memiliki kelarutan yang mirip dengan cairan dan difusivitas yang mirip dengan gas, dan dapat melarutkan berbagai macam produk alami. Sifat solvasinya berubah secara dramatis di dekat titik kritisnya karena perubahan tekanan dan suhu yang kecil. Karbon dioksida superkritis (S-CO₂) banyak digunakan dalam SFE karena kelebihan yang menarik seperti suhu kritis rendah (31 °C), selektivitas, kelembaman, biaya rendah, tidak beracun, dan kemampuan untuk mengekstrak senyawa labil secara termal (Zhang, 2018).

II.9.7 Ekstraksi Cair Bertekanan

Ekstraksi cair bertekanan (PLE) merupakan metode ekstraksi yang digambarkan sebagai ekstraksi pelarut yang dipercepat, ekstraksi pelarut yang ditingkatkan, ekstraksi cairan bertekanan, ekstraksi cairan yang dipercepat, dan ekstraksi pelarut tekanan tinggi. Metode ini menerapkan tekanan tinggi dalam ekstraksi. Tekanan tinggi membuat pelarut dalam keadaan cair di atas titik didihnya sehingga menghasilkan kelarutan yang tinggi, dan penetrasi pelarut yang tinggi dalam matriks. Metode ini secara signifikan mengurangi konsumsi waktu ekstraksi dan pelarut dan memiliki pengulangan yang lebih baik dibandingkan metode lainnya (Zhang, 2018).

II.9.8 Ekstraksi Gelombang Ultrasonic

Ekstraksi dengan bantuan gelombang ultrasonik (UAE), juga disebut sebagai ekstraksi ultrasonik atau sonikasi, dimana metode ini menggunakan energi gelombang ultrasonik dalam ekstraksi. Ultrasound dalam kavitasasi penghasil pelarut mempercepat pembubaran dan difusi zat terlarut serta perpindahan panas, yang meningkatkan efisiensi ekstraksi. Keuntungan metode ini yaitu konsumsi pelarut dan energi yang rendah, serta pengurangan suhu dan waktu ekstraksi. Metode ini dapat digunakan untuk ekstraksi senyawa termolabil dan tidak stabil (Zhang, 2018).

II.10 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan teknik kromatografi yang berguna untuk memisahkan senyawa organik. Kromatografi lapis tipis dilakukan dengan menggunakan logam kaku yang dilapisi lapisan tipis silika gel. Silika gel (atau alumina) berfungsi sebagai fase diam dan fase gerak yang digunakan adalah pelarut cair yang cocok atau campuran pelarut. Fase diam untuk kromatografi lapis tipis juga sering mengandung zat yang berfluoresensi dalam sinar UV (Rosamah, 2019).

Kromatografi lapis tipis merupakan kromatografi serapan yang memiliki fasa diam berupa zat padat dengan fase geraknya berupa zat cair. Prinsip dari pemisahan kromatografi ini yaitu adanya perbedaan sifat fisik dan kimia dari senyawa yaitu kecenderungan dari molekul untuk melarut dalam cairan (kelarutan), kecenderungan molekul untuk menguap dan kecenderungan

molekul untuk melekat pada permukaan (Asfiah, 2020).

Pada kromatografi lapis tipis, mobilitas relatif dari komponen dinyatakan dalam satuan Retardation factor (Rf) yang dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$Rf = \frac{\text{Jarak Tempuh Senyawa}}{\text{Jarak Tempuh Eluen}} \quad (\text{Asfiah, 2020}).$$

II.11 Identifikasi Mikroorganisme

Suatu mikroorganisme yang didapatkan melalui proses isolasi belum dapat teridentifikasi terhadap jenis ataupun dapat diklasifikasikan dengan baik hanya dengan pengamatan makroskopis sehingga perlu dilakukannya identifikasi mikroorganisme. Identifikasi mikroorganisme dilakukan terhadap suatu isolat untuk mengetahui karakteristik spesifik dari isolat tersebut agar dapat dikelompokkan kedalam spesies tertentu. Proses identifikasi yang dapat dilakukan yaitu pengujian aktivitas biokimia suatu isolat dan juga pengecatan mikroorganisme (Bibiana, 1994).

II.11.1 Uji Sitrat

Uji sitrat ini merupakan suatu pengujian yang digunakan untuk melihat kemampuan dari suatu mikroorganisme menggunakan sitrat sebagai sumber karbon dan energi. Pada medium *Simmon's citrate agar* yang digunakan pada pengujian ini, terdapat *brom thymol blue* sebagai indikator pH, sehingga apabila suatu organisme dapat menggunakan sitrat maka akan terjadi peningkatan pH medium menjadi bersifat basa yang dapat mengubah warna

medium dari hijau menjadi biru (Bibiana, 1994).

II.11.2 Uji Indol dan Motilitas

Uji indol merupakan suatu pengujian yang dibutuhkan untuk melihat kemampuan mikroorganisme untuk menggunakan triptofan sebagai sumber karbon dengan menggunakan enzim triptofanase. Asam amino triptofan merupakan komponen asam amino yang lazim terdapat pada protein sehingga asam amino ini dapat digunakan oleh mikroorganisme dengan mudah. Enzim triptofanase ini berfungsi mengkatalisasi penguraian gugus indol dari triptofan yang dimana indol ini akan menumpuk sebagai produk buangan, penumpukan ini dapat diketahui dengan penambahan reagen *kovacs* yang dimana reagen ini dapat bereaksi dengan indol dan menghasilkan senyawa yang berwarna media pada permukaan medium. Medium yang digunakan pada pengujian ini juga bersifat semipadat sehingga dapat digunakan untuk melihat motilitas suatu organisme yang dimana akan terjadi pertumbuhan mikroorganisme disekitar daerah tusukan pada medium (Bibiana, 1994).

II.11.3 Methyl Red

Pengujian *methyl red* adalah uji yang digunakan untuk menentukan adanya fermentasi campuran, yang dimana beberapa bakteri memfermentasikan glukosa dan menghasilkan produk yang bersifat asam sehingga menurunkan pH, sehingga penambahan indikator pH *methyl red* dapat menunjukkan adanya perubahan media menjadi asam. Methyl red

dapat membuat media menjadi berwarna merah yang menandakan pH pada medium menjadi asam (Bibiana, 1994).

II.11.4 Voges Proskauer

Pengujian ini digunakan untuk mengidentifikasi mikroorganisme yang menghasilkan fermentasi 2,3-butanadiol, yang dimana apabila mikroorganisme menghasilkan produk ini akan terjadi penumpukan pada media sehingga pada saat dilakukan penambahan reagen KOH 40% dan 5% larutan alphanaphtol akan mengidentifikasi senyawa asetoin yang merupakan senyawa prekursor dari 2,3-butanadiol yang ditandai dengan adanya warna merah muda pada medium. Pengujian ini tidak secara langsung dapat mengidentifikasi senyawa 2,3-butanadiol sehingga senyawa yang dapat diidentifikasi yaitu asetoin dimana senyawa ini merupakan pendahulu dan selalu didapatkan secara serentak dengan 2,3-butanadiol (Bibiana, 1994).

II.11.5 Pengecatan Gram

Pengecatan Gram ini berfungsi untuk membedakan suatu bakteri dari bakteri Gram positif ataupun Gram negatif serta melihat morfologi dari bakteri. Perbedaan mendasar dari kedua jenis bakteri ini yaitu bakteri Gram positif memiliki dinding sel ber kandungan senyawa peptidoglikan lebih tebal dibandingkan pada dinding sel Gram negatif yang memiliki kandungan lipid yang lebih tebal. Pada pengecatan ini, sel-sel yang tidak dapat melepaskan warna dan akan tetap berwarna seperti warna kristal violet yaitu biru-ungu

disebut bakteri gram positif, sedangkan sel-sel yang dapat melepaskan kristal violet dan mengikat safranin sehingga berwarna merah muda disebut bakteri gram negatif (Fitrah, 2017).

Prinsip dari pengecatan Gram yaitu kemampuan dinding sel untuk mengikat warna awal (kristal violet) setelah pencucian dengan dekolorisator yang dimana apabila memiliki peptidoglikan yang lebih tebal seperti Gram positif maka pewarna dapat terikat dengan baik dan tidak tercuci oleh dekolorisator, namun apabila dinding sel mengandung lipid yang lebih tebal seperti Gram negatif maka pewarna awal dapat tercuci dengan dekolorisator dan akan mengikat pewarna kedua (safranin) (Fitrah, 2017).