

**UJI AKTIVITAS SENYAWA ANTI BAKTERI PROBIOTIK DARI USUS
AYAM BURAS *Gallus domesticus* DALAM MENGHAMBAT BAKTERI
PATOGEN DENGAN METODE KLT (KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS)
BIOAUTOBIOGRAFI**



SHAMAD

H041 18 1003

**DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2023**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**UJI AKTIVITAS SENYAWA ANTI BAKTERI PROBIOTIK DARI USUS
AYAM BURAS *Gallus domesticus* DALAM MENGHAMBAT BAKTERI
PATOGEN DENGAN METODE KLT (KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS)
BIOAUTOBIOGRAFI**

Disusun dan diajukan oleh

SIAMAD

H041 18 1003

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka
Penyelesaian Studi Program Sarjana Program Studi Biologi Fakultas
Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin pada
tanggal, 20 Januari 2023
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan
Menyetujui,



Pembimbing Utama,

Prof. Dr. Hj. Dirayah Rauf Husain, DEA.

NIP 196005251986012001

Pembimbing Pertama,

Dr. Nur Haedar, S.Si., M. Si.

NIP 196801291997022001

Kelua Program Studi

Dr. Magdalena Litaay, M.Sc
NIP 196409291989032002

PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Shamad

NIM : H041 18 1003

Program Studi : Biologi

Jenjang : S1

Menyatakan dengan ini bahwa skripsi dengan Judul Uji Aktivitas Senyawa Anti Bakteri Probiotik dari Usus Ayam Buras *Gallus Domesticus* Dalam Menghambat Bakteri Patogen Dengan Metode Klt (Kromatografi Lapis Tipis) Bioautobiografi adalah karya saya sendiri dan tidak melanggar hak cipta pihak lain. Apabila dikemudian hari skripsi karya saya ini terbukti bahwa sebagian atau keseluruhannya adalah hasil karya orang lain yang saya pergunakan dengan cara melanggar hak cipta orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi.

Makassar, 20 Januari 2023

Yang Menyatakan

Shamad

KATA PENGANTAR

Bismillahirrahmanirrahim

Segala puji bagi Allah *Subhanahu wa Ta'ala*, Sang pengatur setiap jejak kehidupan, yang telah memberikan karunia dan rahmat-Nya kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan penelitian ini dan menyusun skripsi dengan judul “Judul Uji Aktivitas Senyawa Anti Bakteri Probiotik dari Usus Ayam Buras *Gallus Domesticus* Dalam Menghambat Bakteri Patogen Dengan Metode Klt (Kromatografi Lapis Tipis) Bioautobiografi” sebagai salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan dan memperoleh gelar Sarjana Sains di Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin. Shalawat serta salam senantiasa tetap tercurah kepada Rasulullah *Shallahu 'alaihi wa Sallam* sebagai teladan terbaik dalam kehidupan ini.

Proses penyelesaian skripsi ini, merupakan suatu rangkaian perjuangan yang cukup panjang bagi penulis. Selama proses penelitian dan penyusunan skripsi ini tidak sedikit kendala yang penulis hadapi, banyak hal serta kendala yang penulis harus lewati. Berkat usaha dan do'a yang disertai motivasi, bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak akhirnya penelitian dan penyusunan skripsi ini dapat diselesaikan oleh penulis. Oleh karena itu, penulis merasa sangat bersyukur dan mengucapkan terima kasih yang tak terhingga kepada semua pihak yang telah banyak membantu dalam proses penyelesaian skripsi ini.

Penulis menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada keluarga besar terkhusus kepada kedua orang tua, Ayahanda Hamadi S. (Almarhum) dan Ibunda Wa Bungasa serta kedua kakak saya Salvia M. dan Salwiah

M. Jazakumullahu khairan atas dukungan yang telah diberikan kepada penulis baik moril maupun materil serta lantunan do'a-do'a yang selalu dicurahkan kepada penulis. Terima kasih karena telah banyak memberikan nasehat dan teladan selama penulis menempuh pendidikan dari tingkat dasar hingga pada tingkat tertinggi.

Penulis menyampaikan penghargaan setinggi-tingginya dan menyampaikan banyak terima kasih kepada Ibu Prof. Dr. Hj. Dirayah Rauf Husain, DEA. selaku pembimbing utama dan Ibu Dr. Nur Haedar, S.Si., M. Si. selaku pembimbing pertama atas kesediaannya telah meluangkan banyak waktu, tenaga dan pikiran dalam memberikan bimbingan dan motivasi kepada penulis, mulai dari awal penyusunan sampai penyelesaian skripsi ini. Penulis juga mengucapkan banyak terima kasih kepada:

- a. Bapak Prof. Dr. Ir. Jamaluddin Jompa, M.Si., selaku Rektor Universitas Hasanuddin beserta jajarannya.
- b. Bapak Dr. Eng Amiruddin, M.Sc. selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin beserta seluruh staf yang telah membantu penulis dalam hal akademik dan administrasi.
- c. Ibu Dr. Magdalena Litaay, M.Sc selaku Ketua Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin. Penulis mengucapkan terima kasih atas ilmu, masukan, saran dan dukungannya.
- d. Ibu Prof. Dr. Hj. Dirayah Rauf Husain, DEA. selaku Penasehat Akademik (PA) terima kasih atas motivasi, dukungan dan bimbingan yang diberikan kepada penulis dari awal studi hingga penyusunan skripsi ini Ibu Prof. Dr. Sjafaraenan, M.Si. dan Dr. Eddyman W. Ferial S.Si., M.Si selaku dosen

penguji, terima kasih atas segala arahan dan saran serta motivasi tiada henti yang diberikan kepada penulis demi kesempurnaan skripsi ini.

- e. Bapak/Ibu Dosen Departemen Biologi yang telah membimbing dan memberikan ilmunya kepada penulis, baik pada waktu mengikuti perkuliahan maupun pada saat penelitian dan penyelesaian skripsi ini.
- f. Kak Fuad S.Si, dan Kak Rihuh Wardhani, S.Si, M.Si, terima kasih atas bimbingan, saran dan ilmunya selama proses perkuliahan, penelitian hingga penyusunan skripsi ini.
- g. Zia Assya ' Atur Rohma dan Ni Putu Shintia Reski selaku teman penelitian dan telah menemani selama masa-masa penelitian, bimbingan hingga proses penyusunan skripsi ini.
- h. Sahabat-sahabat saya Andri, Rifqah Ainunnisa S.Psi, Wa Ode Elsa Mardani, Wa Ode Shafitra Ramadhany S. S.E, La Ade, Amd. Stat dan L.M Syafaat Adicandra Aniya atas dukungannya selama penelitian sampai proses penyusunan skripsi.
- i. Teman-teman seperjuangan Biologi angkatan 2018, terima kasih atas do'a, dukungan, bantuan dan kebersamaannya selama perkuliahan, terkhusus Farhan Syah Rafli P., Khaerunnisa S.Si, Mutiara Hikmah Shabrina S.Si, Winda Ainun Inayah S.Si, Dian Islamiah dan Muh. Alif Gasali.
- j. Ucapan terima kasih kepada seluruh pihak yang telah membantu dan memberikan dukungan yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu. Penulis mengucapkan banyak terima kasih untuk semua pihak yang mendukung penulis dalam penyelesaian skripsi ini. Semoga segala bantuan,

dukungan, bimbingan dan do'a yang telah diberikan dapat bernilai ibadah di sisi Allah *Subhanahu wa Ta'ala* dan diberikan balasan yang lebih baik.

Makassar, 20 januari 2023

Penulis

ABSTRAK

Komoditi unggas terbesar yang berperan besar dalam memenuhi kebutuhan protein hewani masyarakat Indonesia adalah ayam *broiler* karena waktu pertumbuhannya yang relatif cepat. Pada saluran pencernaan ayam terdapat sekitar 100-400 CFU mikroba yang menguntungkan dan merugikan, hal ini menyebabkan seringnya ayam dari jenis ini terinfeksi oleh bakteri patogen. Bakteri patogen yang sering mencemari ayam jenis ini yaitu *Salmonella sp.*, *Staphylococcus aureus*, dan *Escherichia coli*. Yang dapat mempengaruhi kualitas, kuantitas dan kontinuitas produksi daging ayam sehingga banyak para peternak yang menggunakan pakan berupa AGP (*antibiotic growth promotor*) yang mana dapat menumpuk di tubuh manusia dan dapat menyebabkan manusia menjadi resisten sehingga dapat menyebabkan bakteri patogen mudah menginfeksi tubuh manusia. Untuk mengatasi permasalahan ini dapat digunakan probiotik sebagai pakan alami yang dapat mengatur jumlah mikroorganisme didalam pencernaan. Ayam kampung Buras *Gallus domesticus* yang dibiarkan hidup liar di sekitaran pesisir mampu memperoleh bakteri probiotik yang lebih kuat. Kabupaten pangkep merupakan salah satu wilayah pesisir yang ada di sulawesi selatan. Penelitian ini menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Bioautobiografi yang dapat menarik dan memisahkan senyawa serta untuk mendeteksi dan melihat efektivitas suatu senyawa antimikroba dalam menghambat bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Hasil yang diperoleh yaitu diperoleh 6 isolat dan isolat yang terpilih adalah PaPJ1 dan PaPB3 yang mampu menghasilkan daya hambat sebesar 7,6 – 14 mm dan 10,6 – 15 mm dan bersifat bakterisidal. Hasil uji KLT Bioautobiografi mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen *Escherichia coli* pada R_f (0,375 dan 0,5) dan *Staphylococcus aureus* pada R_f (0,7 dan 0,92).

Kata kunci: Ayam Buras *Gallus domesticus*, Kabupaten Pangkep, Bakteri Probiotik, KLT Bioautobiografi.

ABSTRACT

The largest poultry commodity that plays a major role in meeting the needs of animal protein for the Indonesian people is broiler chickens because of their relatively fast growth time. In the digestive tract of chickens there are around 100-400 CFU of beneficial and harmful microbes, this causes chickens of this breed to be frequently infected by pathogenic bacteria. Pathogenic bacteria that often contaminate this type of chicken are *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli*. Which can affect the quality, quantity and continuity of chicken meat production so that many farmers use feed in the form of AGP (antibiotic growth promotor) which can accumulate in the human body and can cause humans to become resistant so that it can cause pathogenic bacteria to easily infect the human body. To overcome this problem, probiotics can be used as natural feed which can regulate the number of microorganisms in the digestive tract. Free-range Buras *Gallus domesticus* chickens that are allowed to live wild around the coast are able to obtain stronger probiotic bacteria. Pangkep Regency is one of the coastal areas in South Sulawesi. This study used the Bioautobiography Thin Layer Chromatography (TLC) method which can extract and separate compounds as well as to detect and see the effectiveness of an antimicrobial compound in inhibiting *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* bacteria. The results obtained were 6 isolates and the selected isolates were PaPJ1 and PaPB3 which were able to produce an inhibitory power of 7.6 – 14 mm and 10.6 – 15 mm and were bactericidal. The results of the Bioautobiography TLC test were able to inhibit the growth of pathogenic bacteria *Escherichia coli* at Rf (0.375 and 0.5) and *Staphylococcus aureus* at Rf (0.7 and 0.92).

Key Word: chicken *Gallus domesticus*, Pangkep Regency, Probiotic Bacterial, TLC Bioautobiography.

Daftar ISI

Lembaran Pengesahan Skripsi	ii
Pernyataan Keaslian.....	iii
Kata Pengantar.....	iv
Abstrak.....	viii
Abstrack.....	ix
Daftar Isi.....	x
Daftar Tabel.....	xii
Daftar Gambar.....	xii
Daftar Lampiran.....	xiv
BAB I	1
PENDAHULUAN	1
I.1 Latar Belakang	1
I.2 Tujuan Penelitian	4
I.3 Manfaat penelitian.....	5
I.4 Waktu dan Tempat Penelitian	5
BAB II.....	6
TINJAUAN PUSTAKA	6
II.1 Ayam Buras <i>Gallus gallus domesticus</i>	6
II.2 Probiotik	8
II.3 Bakteri Probiotik.....	12
II.4 Bakteri Pathogen (<i>Escherichia coli</i> dan <i>Staphylococcus aureus</i>).....	15
II.5 Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Bio-Autobiografi	18
BAB III	20
METODE PENELITIAN.....	20
III.1 Alat	20
III.2 Bahan.....	20
III.3 Cara Kerja.....	21
III.3.1 Sterilisasi Alat.....	21
III.3.2 Pembuatan Medium	21
III.3.3 Pengambilan Sampel.....	22
III.3.4 Isolasi Bakteri Asam Laktat.....	22
III.3.5 Pemurnian Bakteri Asam Laktat.....	23

III.3.6 Pembuatan Stok Isolat Bakteri Asam Laktat	23
III.3.8 Uji Potensi Bakteri Probiotik.....	24
III.3.9 Pengukuran Kurva Pertumbuhan Bakteri Probiotik	25
III.3.10 Uji Daya Hambat pada Bakteri Probiotik Terhadap Bakteri Patogen	25
III.3.11 Ekstraksi dan Partisi.....	26
III.3.12 Pemisahan Secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	26
III.3.13 Pengujian Secara KLT-Bioautobiografi	27
III.3.14 Analisis Data.....	27
BAB IV	28
HASIL DAN PEMBAHASAN.....	28
IV.1 Pengambilan Sampel	28
IV.2 Isolasi Bakteri Asam Laktat	30
IV.3 Permunian Bakteri Asam Laktat	32
IV.4 Pembuatan Stok Bakteri Asam Laktat	32
IV.5 Pengamatan Morfologi Bakteri Asam Laktat	33
IV.5.1 Pengamatan Morfologi Koloni Bakteri Asam Laktat.....	33
IV.5.2 Pengamatan Morfologi Sel (Pengecatan Gram) Bakteri Asam Laktat.....	35
IV.6 Uji Potensi Bakteri Probiotik	36
IV.6.1 Uji Ketahanan Terhadap Asam Lambung (Ph)	36
IV.6.2 Uji Ketahanan Terhadap Garam Empedu.....	39
IV.7 Pengukuran Kurva Pertumbuhan Bakteri Probiotik.....	43
IV.8 Uji Daya Hambat pada Bakteri Probiotik Terhadap Bakteri Patogen.....	48
IV.9 Ekstraksi dan Partisi Isolat Bakteri Probiotik	55
IV.10 Pemisahan Secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT).....	57
IV. 11 Pengujian Secara KLT-Bioautobiografi.....	60
BAB V	64
KESIMPULAN DAN SARAN.....	64
V.1 Kesimpulan.....	64
V.2 Saran	64
DAFTAR PUSTAKA	65
LAMPIRAN.....	75

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Kode isolat Bakteri.....	33
2. Hasil Pengamatan morfologi koloni isolat BAL.....	34
3. Hasil Pengamatan morfologi sel isolat BAL.....	36
4. Hasil Pengamatan Uji Ketahanan Terhadap Asam Lambung.....	38
5. Hasil Pengamatan Uji Ketahanan Terhadap Garam Empedu.....	40
6. Nilai OD pertumbuhan BAL PaPJ1 dan PaPB3 tiap 2 jam.....	43
7. Zona bening yang terbentuk pada uji daya hambat (<i>blindisk</i>) 24 jam.....	49
8. Zona bening yang terbentuk pada uji daya hambat (<i>blindisk</i>) 48 jam.....	49
9. Zona bening yang terbentuk pada uji daya hambat (Pencadang) 24 jam.....	50
10. Zona bening yang terbentuk pada uji daya hambat (Pencadang) 48 jam.....	50
11. Hasil pemisahan ekstrak isolat PaPJ1 dan PaPB3 dengan KLT.....	50
12. Perbedaan masa jenis Etil Asetat dan Super natan Bebas sel.....	56
13. Hasil evaporasi supernatant bebas sel isolat bakteri PaPJ1 dan PaPB3.....	57

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Ayam <i>Gallus domesticus</i>	6
2. Anatomi Saluran Pencernaan Ayam <i>Gallus doomesticus</i>	7
3. Kemampuan probiotik mereduksi mikrobia patogen.....	10
4. Kriteria dan karakteristik probiotik yang aman.....	12
5. Morfologi Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	17
6. Morfologi Bakteri <i>Escherichia coli</i>	17
7. Lokasi pengambilan sampel di Desa Bulu Cindea, Kabupaten Pngkep.....	28
8. Sampel Ayam Kampung <i>Gallus domesticus</i>	29
9. Hasil isolasi BAL pada medium <i>MRSA</i>	31
10. Hasil Pemurnian isolasi BAL.....	32
11. Stok Isolat BAL.....	33
12. Hasil Pengamatan morfologi koloni isolat BAL.....	34
13. Hasil Pengamatan morfologi sel (Pengecatan gram) isolat BAL.....	35
14. Pertumbuhan BAL pada media <i>MRSB</i> dengan pH 3.....	37
15. Pertumbuhan BAL pada media <i>MRSB</i> dan garam empedu 1% dan 5%.....	40
16. Kurva pertumbuhan bakeri isolat PaPJ1 24 jam dengan interval waktu 2 jam..	44
17. Kurva pertumbuhan bakeri isolat PaPB3 24 jam dengan interval waktu 2 jam.	45
18. Hasil uji daya hambat (<i>blankdisk</i>) 24 jam.....	49
19. Hasil uji daya hambat (<i>blankdisk</i>) 48 jam.....	49
20. Hasil uji daya hambat (Pencadang) 24 jam.....	50
21. Hasil uji daya hambat (Pencadang) 24 jam.....	50
22. Profil Kromatografi Lapis Tipis (KLT) ekstrak isolat PaPJ1 dan PaPB3.....	59
23. Hasil kromatografi lapis tipis KLT-Bioautobiografi.....	62

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Skema Kerja Uji Bakteri Probiotik Ayam Buras <i>Gallus domesticus</i>	75
2. Skema Kerja Isolasi Bakteri Probiotik Ayam Buras <i>Gallus domesticus</i>	76
3. Lokasi Pengambilan Sampel Desa Bulu Cindea Kabupaten Pangkep.....	77
4. Preparasi dan Proses Isolasi Bakteri Probiotik.....	77
5. Hasil Pemurnian Isolat Bakteri Asam Laktat dari Kab. Pangkep.....	78
6. Stock Bakteri Asam Laktat.....	78
7. Pengamatan Morfologi koloni dan sel (Pengecatan Gram) BAL.....	79
8. Uji daya Hambat Bakteri Probiotik.....	79
9. Kurva Pertumbuhan Bakteri Probiotik.....	80
10. Ekstraksi dan Partisi Bakteri Probiotik.....	80
11. Pemisahan secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Bakteri Probiotik.....	81
12. Pengujian Secara KLT-Bioautobiografi Bakteri Probiotik.....	81
13. Perhitungan Nilai R_f	82
14. Perhitungan Waktu Generasi dan Waktu Penggandaan	83

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Salah satu komoditi unggas yang berperan besar dalam memenuhi kebutuhan protein hewani masyarakat Indonesia adalah ayam *broiler*, dimana jenis ayam ini memiliki laju pertumbuhan yang relatif cepat karena dapat dipanen pada usia 5 minggu (Aziza dkk., 2020). Indonesia sebagai negara dengan produsen ayam broiler terbesar ke-6 di dunia menurut FAO pada tahun 2018, produksinya dapat mencapai 3,8 ton per satu kali produksi, hal ini disebabkan banyaknya permintaan ayam di tiap provinsi, salah satunya provinsi Sulawesi Selatan. Tercatat pada tahun 2020 permintaan akan daging ayam *broiler* mencapai 78.878,60 ton (Sumber: Direktorat Jendral Peternakan dan Kesehatan Hewan, Kementan). Hal ini menjadi tantangan bagi pemerintah di Sulawesi Selatan untuk memenuhi banyaknya permintaan daging ayam *broiler* namun tidak mengesampingkan kesehatan masyarakat. Kabupaten Pangkep atau Pangkajene Kepulauan merupakan salah satu kabupaten yang menurut survey di kabupaten tersebut sekitar 93,95 % masyarakat ber profesi sebagai petani/peternak (Asti, 2019), yang menyebabkan kabupaten ini menjadi kabupaten terbesar kedua sebagai produsen penghasil ayam broiler di Sulawesi Selatan setelah kabupaten Maros (Badan Pusat Statistik Sulawesi Selatan)

Ayam *Gallus domesticus* memiliki banyak manfaat diantaranya dapat menghasilkan daging (Ali dkk.,2018) dapat menghasilkan telur untuk konsumsi (Hartono dkk., 2015), serta dapat menghasilkan probiotik (Djaya dkk., 2013). Secara alami bakteri saluran pencernaan ayam terdiri dari bakteri proteolitik

(52×10^7 CFU/g), fermentatif (57×10^7 CFU/g), amilolitik (118×10^7 CFU/g), dan selulolitik (63×10^7 CFU/g) (Abdurahman dan Yanti, 2018). Pada saluran pencernaan ayam terdapat sekitar 100-400 CFU mikroba yang menguntungkan dan merugikan (Amin dkk., 2020), hal ini menyebabkan seringnya ayam dari jenis ini terinfeksi oleh bakteri patogen. Bakteri patogen yang sering mencemari ayam jenis ini yaitu *Salmonella sp.*, *Staphylococcus aureus*, dan *Escherichia coli* (Fatiqin dkk., 2019). Ketiga bakteri ini merupakan jenis bakteri yang termasuk dalam golongan bakteri *coliform* dimana hampir semua yang termasuk golongan bakteri ini bersifat patogen dan menimbulkan penyakit (Kartika dkk., 2014).

Permasalahan ini tentunya dapat berpengaruh terhadap kualitas, kuantitas dan kontinuitas pangan tidak terkecuali daging ayam *Gallus domesticus* yang sering menjadi hambatan dalam usaha peternakan, sehingga banyak peternak unggas menggunakan pakan *antibiotic growth promotor* pada ternak mereka khususnya ternak ayam *broiler* (Isnaeni dkk., 2015), akan tetapi penggunaan *antibiotic growth promotor* dapat menimbulkan efek merugikannya pada konsumennya, dimana antibiotik yang terdapat pada pakan ternak akan ikut terserap oleh daging ternak sehingga orang yang mengonsumsi daging ternak tersebut akan ikut merasakan efek dari antibiotik yang terdapat pada ternak unggas (Mutmainnah dkk., 2011). Penggunaan antibiotik ini diklaim juga tidak efektif yang dikarenakan bakteri patogen dapat resisten terhadap antibiotik jika penggunaannya secara terus-menerus dan dalam jumlah yang banyak, yang dapat menciptakan strain-strain bakteri baru yang kebal terhadap antibiotik (Sumarsih dkk., 2012).

Untuk mengatasi permasalahan tersebut telah secara alami tersedia mikroorganisme yang disebut probiotik. Probiotik sendiri merupakan

mikroorganisme hidup yang apabila dikonsumsi dapat meningkatkan kesehatan ternak dengan cara menyeimbangkan mikroflora di dalam saluran pencernaan (Astuti dkk., 2020). Sudah banyak penelitian mengenai probiotik sebagai senyawa anti mikroba yang di isolasi dari saluran pencernaan hewan diantaranya penelitian Yulvizar (2013) tentang bakteri probiotik *Rastrelliger* sp. pada usus ikan kembung, Manin (2010) tentang potensi *Lactobacillus acidophilus* dan *Lactobacillus fermentum* dari saluran pencernaan ayam buras asal lahan gambut, Penelitian Sari dkk. (2013) dan Nurbaiti dkk. (2016) skrening bakteri asam laktat yang diisolasi dari usus ayam *Gallus domesticus* serta hasil dari penelitian Ali dkk. (2018) tentang potensi senyawa BAL pada usus ayam *Gallus domesticus* yang mempunyai potensi menjadi bakteri probiotik, dan masih banyak lagi penelitian yang lainnya.

Pada penelitian ini sampel yang digunakan adalah ayam dari jenis *Gallus domesticus* atau ayam kampung, karena ayam kampung di perkirakan dapat menghasilkan kualitas bakteri probiotik yang lebih baik, mwnurut (Manin, 2010) ayam buras yang dipelihara pada umumnya hidup dengan pakan seadanya yang diperoleh dari lingkungan sekitarnya. Kondisi pakan yang marginal, diduga akan mempengaruhi jenis dan populasi mikroba di dalam setiap segmen saluran pencernaannya dan telah dibuktikan oleh penelitian sebelumnya oleh (Gunawan, 2018) yang melakukan isolasi dan uji daya hambat dari ekstrak isolate bakteri ayam *Gallus domesticus* di kabupaten Takalar dengan memperoleh bakteri probiotik yang baik.

Penelitian ini juga menggunakan metode bioautobiografi yang mengambil prinsip kromatografi lapis tipis (KLT), dimana kromatografi lapisan tipis (KLT) berfungsi untuk menarik dan memisahkan senyawa yang bersifat polar dan non

polar pada suatu lempeng silika. fungsi dari metode bioautobiografi dalam penelitian ini yaitu untuk mendeteksi dan melihat efektivitas suatu senyawa antimikroba dalam menghambat bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Untuk itu pentingnya dilakukan penelitian ini adalah untuk mengetahui efektivitas senyawa yang dihasilkan oleh bakteri probiotik yang diisolasi dari usus ayam *Gallus domesticus* yang diambil dari kabupaten Pangkep dalam menghambat bakteri patogen menggunakan metode bioautobiografi.

I.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah

1. Untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi bakteri yang berpotensi sebagai probiotik yang berasal dari usus ayam buras *Gallus domesticus* yang berasal dari daerah pesisir Kabupaten Pangkep.
2. Untuk mengetahui kemampuan daya hambat senyawa antimikroba yang dihasilkan oleh bakteri probiotik isolat dari usus ayam buras *Gallus domesticus* terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.
3. Untuk mengetahui potensi senyawa ekstrak bakteri probiotik isolat dari usus ayam buras *Gallus domesticus* dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* dan mengetahui golongan senyawa anti bakteri dengan menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) – Bioautobiografi.

I.3 Manfaat penelitian

Adapun manfaat penelitian ini adalah untuk memberikan informasi ilmiah tentang aktivitas antimikroba dan potensi senyawa yang terkandung dalam bakteri

probiotik isolat dari usus ayam buras *Gallus domesticus* pada bakteri pathogen *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* serta sifat fisik senyawa yang dihasilkan dari bakteri probiotik isolat dari usus ayam buras *Gallus domesticus* dalam menghambat bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

I.4 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Agustus-Oktober 2022. di Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Ayam Buras *Gallus gallus domesticus*

Adapun klasifikasi dari ayam Buras *Gallus gallus domesticus* yaitu (Rahayu, 2011):

Kingdom : Animalia

Filum : Chordata

Subfilum : Vertebrata

Kelas : Aves

Subkelas : Neornithes

Superordo : Superordo

Ordo : Galliformes

Famili : Phasianidae

Genus : *Gallus*

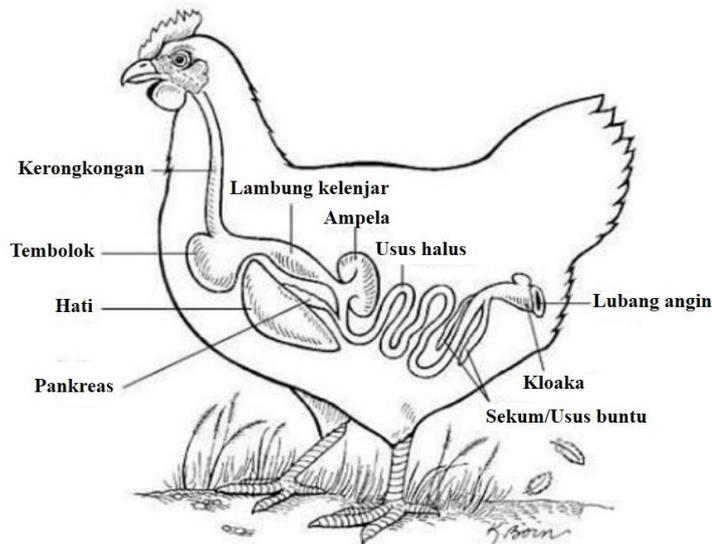
Spesies : *Gallus domesticus*



Gambar 1. Ayam *Gallus domesticus*
(Sumber: Teme dkk., 2019)

Jenis ayam ini merupakan salah satu ternak unggas yang sangat berperan dalam meningkatkan ketahanan pangan nasional yaitu sebagai sumber gizi masyarakat khususnya sebagai sumber protein hewani baik dari telur maupun dagingnya. Peranan ayam jenis ini sebagai penyedia daging dan telur untuk memenuhi konsumsi protein hewani sangat berarti terutama bagi masyarakat (Jannah dkk., 2017). Jenis ayam ini termasuk komoditi unggas yang memberikan kontribusi besar dalam memenuhi kebutuhan protein asal hewani bagi masyarakat Indonesia yang memiliki laju pertumbuhan yang cepat karena dapat dipanen pada umur 5 minggu (Azizah dkk., 2020). Jenis ayam ini juga merupakan salah satu

hewan ternak yang mudah terserang penyakit. Salah satu jenis penyakit yang sering menyerang peternakan unggas adalah infeksi bakteri (Diarlin dkk., 2013).



Gambar 2. Anatomi Saluran Pencernaan Ayam *Gallus doomesticus* (Sumber: Rahmawati, 2016).

Pada ternak unggas mempunyai saluran pencernaan yang sederhana, yaitu terdiri dari rongga mulut, *esophagus*, tembolok, *proventriculus*, *gizzard* usus halus, caeca, usus besar, dan kloaka (Hamzah, 2013). Histologi usus halus ayam broiler dan ayam buras memiliki perbedaan. Villi-villi pada usus halus ayam broiler memiliki jumlah yang lebih banyak dan ukurannya lebih panjang dibandingkan villi-villi usus halus pada ayam kampung. Tingkat efisiensi pakan ayam broiler lebih tinggi daripada tingkat efisiensi pakan ayam kampung (Rahmanto, 2012). Menurut Denbow (2000) proses pencernaan kimiawi berlangsung pada usus halus. Usus halus merupakan organ utama tempat berlangsungnya pencernaan dan absorpsi produk pencernaan dan mempunyai peranan penting dalam transfer nutrisi (Suprijatna dkk., 2008). Usus halus merupakan saluran berkelok-kelok yang panjangnya sekitar 6–8 meter, lebar 25 mm dengan banyak lipatan yang disebut vili

atau jonjot-jonjot usus (Alfiansyah, 2011). Pada ayam dewasa, panjang usus halus sekitar 62 inci atau 1,5 meter.).

II.2 Probiotik

Probiotik diambil dari bahasa Yunani yang berarti “untuk hidup”, dimana istilah probiotik pertama kali digunakan oleh Lilley dan Stillwel pada tahun 1965 yang memiliki arti yaitu sebagai suatu substansi yang dihasilkan oleh mikroba yang dapat merangsang pertumbuhan mikroba lain. Kemudian pada tahun 1974 Parker menjelaskan substansi yang memiliki kontribusi dimaksud yaitu mikroba hidup pada intestin. Kemudian pada tahun 1989 Fuller memperbaiki definisi dari probiotik, dimana menurutnya probiotik merupakan suplemen makanan yang menguntungkan bagi inang yang mengonsumsi melalui keseimbangan mikrobial intestin (Sunaryanto dkk., 2014). Probiotik berasal dari dua sub-kata yaitu pro mendukung dan biotik kehidupan, sehingga jika digabungkan menjadi pendukung kehidupan (Astuti dkk., 2020). Probiotik diartikan sebagai suplemen pakan yang berisi mikroba hidup (*direct feed microbials*) baik bakteri, jamur kapang atau khamir yang dapat memberikan keuntungan bagi inangnya karena dapat mampu memberikan keseimbangan mikrobial di dalam saluran pencernaan inangnya (Sumarsih dkk., 2012). Probiotik juga dapat diartikan sebagai pakan tambahan berupa mikroorganisme hidup dalam bentuk bakteri atau jamur yang menguntungkan yang diberikan secara oral, baik dengan cara di konsumsi langsung maupun di campur dengan pakan ternak lainnya (Irawan dkk., 2020).

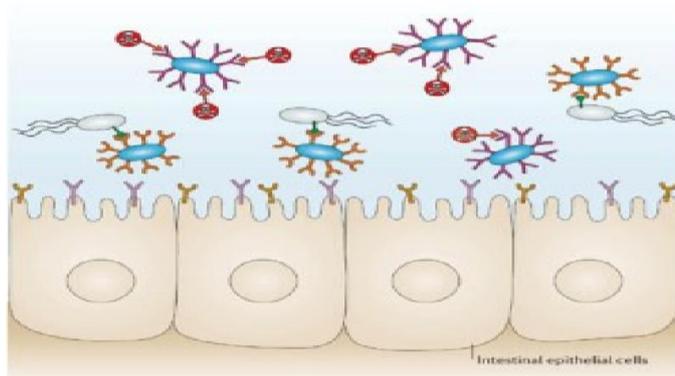
Probiotik tergolong dalam makanan fungsional dimana bahan makanan ini mengandung komponen-komponen yang dapat meningkatkan kesehatan ternak

dengan cara memanipulasi komposisi bakteri, jamur dan mikroorganisme lainnya yang ada didalam saluran pencernaan, probiotik juga dapat meningkatkan pertumbuhan dan efisiensi pakan ternak tanpa mengakibatkan ikut terserapnya komponen dari probiotik sehingga tidak menimbulkan residu dan tidak terjadi mutasi pada ternak (Djaya dan Hidayat, 2013). Selain itu penambahan probiotik pada pakan ternak dapat berfungsi sebagai zat pemacu tumbuh, meningkatkan konversi pakan, pencegah terhadap mikroba penghasil patogen terutama pada ternak muda yang gampang terserang penyakit serta sebagai pengurai faktor anti nutrisi seperti anti tripsin (Febriyossa dkk., 2013). Fungsi lain dari penambahan probiotik pada pakan ternak yaitu dapat mengurangi kemampuan mikroorganisme patogen dalam menghasilkan senyawa toksin, mengurangi efek hambatan pertumbuhan karena nutrisi dari pakan ternak yang tidak seimbang, merangsang produksi enzim pencernaan, serta dihasilkannya vitamin dan substansi mikrobial yang dapat memberi kesehatan pada pencernaan ternak (Huda dkk., 2019). Vitamin yang dihasilkan oleh mikroba probiotik yaitu berupa Vitamin B (Djaya dan Hidayat, 2013). Senyawa-senyawa racun yang dihasilkan pada metabolisme bakteri probiotik seperti asam laktat, hidrogen peroksida, bakteriosin yang bersifat antimikroba dan antibiotik mampu menekan pertumbuhan bakteri patogen (Yulvizar, 2013). Senyawa yang dikandung oleh probiotik dapat digunakan oleh penderita laktosa intolerans (Tidak mampu mencerna laktosa) jika digunakan strain bakteri yang mampu menghasilkan senyawa β galactosidase dalam fermentasi susu, probiotik juga dapat digunakan sebagai zat anti karsinogen atau zat anti kanker yang sudah di buktikan oleh penelitian daniluk pada tahun 2012 bahwa *Lactobacillus acidophilus* yang berasal dari manusia yang resisten terhadap garam

empedu dapat menurunkan 3 enzim yang memiliki peranan penting untuk pembentukan senyawa karsinogen. (Sunaryanto dkk., 2014).

Mekanisme kerja dari probiotik ada tiga , diantaranya (Sumarsih dkk., 2012):

1. Melekat / menempel dan berkolonisasi dalam saluran pencernaan. Kemampuan probiotika untuk bertahan hidup dalam saluran pencernaan dan menempel pada sel-sel usus adalah sesuatu yang diinginkan. Hal ini merupakan tahap pertama untuk berkolonisasi, dan selanjutnya dapat dimodifikasi untuk sistem imunisasi/ kekebalan hewan inang. Kemampuan menempel yang kuat pada sel-sel usus ini akan menyebabkan mikroba-mikroba probiotik berkembang dengan baik dan mikroba-mikroba patogen tereduksi dari sel-sel usus hewan inang, sehingga perkembangan organisme-organisme patogen yang menyebabkan penyakit seperti *Eshericia coli*, *Salmonella thyphimurium* dalam saluran pencernaan akan mengalami hambatan.



Gambar 3. Kemampuan probiotik mereduksi mikrobia patogen (Sumber: Sumarsih dkk., 2012).

2. Berkompetisi terhadap makanan dan memproduksi zat anti mikrobial Mikroba. Probiotik menghambat organisme patogenik dengan berkompetisi untuk

mendapatkan sejumlah terbatas substrat bahan makanan untuk difermentasi. Substrat bahan makanan tersebut diperlukan agar mikroba probiotika dapat berkembang dengan baik. Substrat bahan makanan yang mendukung perkembangan mikroba probiotik dalam saluran pencernaan disebut “prebiotik”. Prebiotik ini terdiri dari bahan-bahan makanan yang pada umumnya banyak mengandung serat. Sejumlah probiotik menghasilkan senyawa / zat-zat yang diperlukan untuk membantu proses pencernaan substrat bahan makanan tertentu dalam saluran pencernaan yaitu enzim.

3. Menstimulasi mukosa dan meningkatkan sistem kekebalan hewan inang. Mikroorganisme probiotika mampu mengatur beberapa aspek dari sistem kekebalan hewan inang. Kemampuan mikroba probiotika mengeluarkan toksin yang mereduksi / menghambat perkembangan mikroba-mikroba patogen dalam saluran pencernaan, merupakan suatu kondisi yang dapat meningkatkan kekebalan hewan inang. Toksin-toksin yang dihasilkan tersebut merupakan antibiotika bagi mikroba-mikroba patogen, sehingga penyakit yang ditimbulkan oleh mikroba patogen tersebut akan bekurang dan dapat hilang atau sembuh dengan sendirinya. Hal ini akan memberikan keuntungan terhadap kesehatan hewan inang sehingga tahan terhadap serangan penyakit.

Pada saat memilih mikroorganisme untuk dijadikan sebagai probiotik yaitu harus memiliki kriteria, tidak bersifat patogen atau merugikan bagi inang, tidak bersifat patogen bagi manusia dan hewan lainnya, tidak mengganggu keseimbangan ekosistem lainnya, mikroba harus mudah dipelihara dan diperbanyak, dapat hidup dengan baik dan berkembang biak di dalam usus, dapat dipelihara dalam media yang memungkinkan untuk diintroduksi ke dalam usus dan dapat tahan dengan

suasana asam (Supriatna dkk., 2016). Adapun menurut Gaggia dkk., 2010) skema mikroba probiotik yang baik yaitu



Gambar 4. Kriteria dan karakteristik probiotik yang aman (Sumber: Abdurahman dan Yanti, 2018).

II.3 Bakteri Probiotik

Probiotik berasal dari dua sub kata, yaitu “Pro” bearti mendukung dan “Biotik” beararti hidup, sehingga apabila digabungkan maka probiotik sendiri adalah pendukung kehidupan (Astuti dkk., 2020). Menurut Gibson dkk. (2017) Probiotik adalah suatu substrat yang secara selektif dimanfaatkan oleh mikroorganisme pada inang yang dapat menimbulkan efek peningkatan kesehatan, dimana defenisi ini merupakan revisi akhir dari pengertian probiotik yang disahkan pada pertemuan para ahli dan peneliti pada bulan desember 2016 yang diselenggarakan oleh *International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics* (Abdurahman dan Yanti, 2018). Probiotik dapat berupa bakteri, jamur

atau ragi, tapi yang paling bersifat probiotik adalah bakteri (2011). Bakteri probiotik merupakan mikroorganisme hidup yang diberikan sebagai suplemen makanan atau minuman yang memberikan efek kesehatan bagi manusia maupun hewan. Bakteri probiotik mampu menghasilkan asam laktat (Diarlin dkk.,2013). Jenis mikroba yang digunakan sebagai probiotik sangat terkait pada sifat kimia dan fisik lingkungan pencernaan. Sebagian organ pencernaan unggas (tembolok, proventriculus dan rempela) mempunyai keasaman yang tinggi, oleh karena itu mikroba yang digunakan harus tahan terhadap asam (Febriyossa dan Periadnadi, 2013). Pada saluran pencernaan ayam terdapat sekitar 100-400 CFU mikroba yang menguntungkan dan merugikan (Amin dkk., 2020). Secara umum bakteri probiotik hidup didalam saluran pencernaan dan bermutualisme dengan tubuh inangnya, hidup pada pH 2-4 (Mutmainnah dkk., 2011), secara alami bakteri saluran pencernaan ayam terdiri dari bakteri proteolitik (52×10^7 CFU/g), fermentatif (57×10^7 CFU/g), amilolitik (118×10^7 CFU/g), dan selulolitik (63×10^7 CFU/g) (Abdurahman dan Yanti, 2018). Mikroba menguntungkan seperti *Escherichia coli*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bacteroides*, *Enterococcus*, *Clostridia* dan yang merugikan seperti *Salmonella* sp. Bakteri tersebut hidup dalam keseimbangan. Kestabilan mikroorganisme pada usus bisa terganggu apabila antibiotik, infeksi bakteri, virus, kemoterapi, radiasi, pola makan, stres dan iklim menyerang inangnya (Amin dkk., 2020). Bakteri patogen bisa menginfeksi melalui makanan, menuju sistem pencernaan makanan dan akhirnya menimbulkan luka kecil pada tubuh dan disertai dengan tanda-tanda seperti kehilangan nafsu makan dan lemah (Linggarjati dkk., 2013). Mikroorganisme probiotik khususnya bakteri mampu menghasilkan anti

mikroba untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen di dalam saluran pencernaan, selain itu mikroorganisme khususnya bakteri probiotik juga menghasilkan asam organik yang dapat menurunkan pH menjadi asam pada saluran pencernaan dan dapat berpengaruh terhadap pertumbuhan bakteri patogen dimana jika bakteri probiotik terus melakukan metabolisme maka hasil metabolismenya akan digunakan sebagai pertumbuhan dan akan menekan pertumbuhan bakteri patogen sehingga bakteri baik mendominasi saluran pencernaan (Irawan dkk., 2020). Hal ini sesuai dengan syarat utama strain yang dapat digunakan sebagai agensia probiotik adalah memiliki resistensi terhadap asam dan empedu sehingga dapat mencapai intestin dan memiliki kemampuan menempel pada mukosa, Syarat lain yang perlu dimiliki oleh bakteri probiotik adalah kemampuannya menghasilkan substansi antimikrobia sehingga mampu menekan pertumbuhan bakteri patogen enteric (Sunartyanto dkk., 2014). Salah satu upaya peternak yaitu dengan penggunaan *Antibiotic Growth-promotor* (AGP) untuk meningkatkan produksi (Lokapinasari dkk., 2019), namun Penggunaan *antibiotic growth promotor* menimbulkan efek merugikan disebabkan ikut terserap dengan nutrisi dan tertimbun pada daging ternak unggas sehingga secara tidak langsung konsumen juga mendapatkan antibiotik (Sulistyanto dkk., 2012). Penggunaan AGP sebagai imbuhan pakan telah dilarang oleh pemerintah sejak 1 Januari 2018 yang diatur dalam Permentan Nomor 14 Tahun 2017 tentang Klasifikasi Obat Hewan. Peraturan tersebut ditetapkan agar kedepannya masyarakat tidak resisten terhadap antibiotik akibat mengkonsumsi produk unggas (Irawan dkk., 2020). Oleh karena itu penggunaan antibiotik digantikan dengan probiotik dimana salah satu alasannya

adalah penggunaan probiotik yang apabila dikonsumsi tidak menimbulkan penumpukan residu dan senyawa pada probiotik tidak ikut terserap oleh tubuh sehingga aman untuk dikonsumsi masyarakat dan yang paling penting adalah masyarakat tidak resisten terhadap bakteri penyebab patogen (Djaya dan Hidayat, 2013).

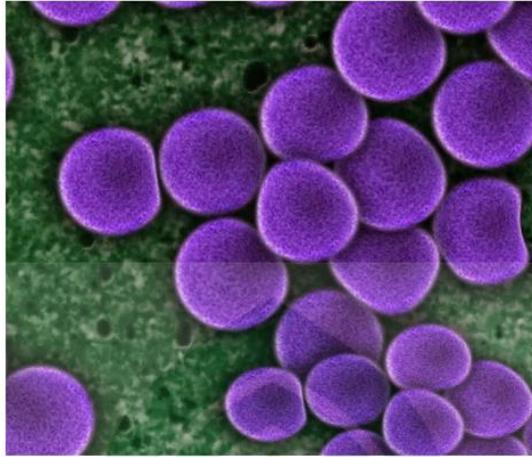
II.4 Bakteri Pathogen (*Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*).

Bakteri patogen adalah bakteri yang mampu menyebabkan penyakit. Bakteri patogen dapat menyebar melalui populasi manusia dalam berbagai cara. Saat ini, peningkatan jumlah infeksi meningkat disebabkan oleh mikroorganisme yang sebelumnya dianggap tidak patogen, terutama anggota flora normal. Infeksi ini berkembang dalam tubuh manusia yang faktor kekebalan tubuhnya dirusak oleh penyakit lain atau karena terapi antibiotik dan terapi immunosupresif yang berkepanjangan. Mikroorganisme demikian disebut patogen oportunistik. Patogen tersebut dapat menimbulkan penyakit pada individu yang sehat (Riskawati, 2016).

Secara umum patogenesis bakteri diawali dengan masuknya bakteri ke dalam tubuh inang melalui bermacam-macam cara, antara lain saluran pernafasan, saluran pencernaan, rongga mulut, kuku, dan lainlain. Setelah itu terjadi proses adhesikolonisasi. Pada proses ini bakteri menempel pada permukaan sel inang, perlekatan bakteri terjadi pada sel epitel. Pada proses ini, perlekatan bakteri ke sel permukaan sel inang memerlukan protein adhesin. Adhesin dibagi menjadi dua, yaitu fimbrial dan afimbrial. Adhesi fimbrial bertindak sebagai ligan dan berikatan dengan reseptor yang terdapat pada permukaan sel inang. Fili sering dikenal sebagai antigen kolonisasi karena peranannya sebagai alat penempelan pada sel lain (Pratiwi, 2012).

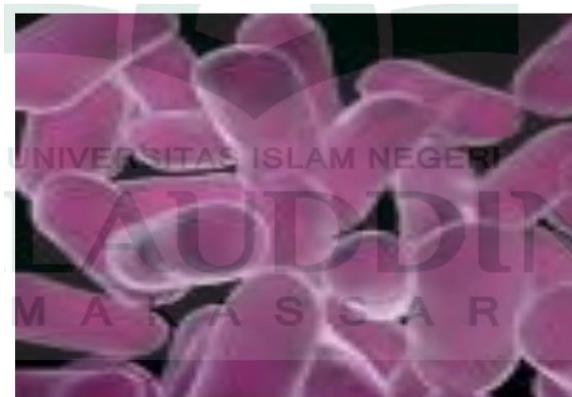
Bakteri yang bersifat patogen bersifat merugikan bagi makhluk hidup, bakteri ini menyerang tumbuhan, hewan, manusia bahkan bakteri lainnya. Bakteri yang sering menyeraang makhluk hidup khususnya hewan ternak adalah bakteri dari golongan *coliform* dimana bakteri Koliform termasuk bakteri yang dikeluarkan dari saluran pencernaan hewan dan manusia (Suwito, 2010). Bakteri golongan koliform yang biasa menyerang hewan ternak khususnya pada ayam yaitu bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*, Bakteri *Staphylococcus aureus* berasal dari makanan dan bakteri ini menghasilkan racun yang dapat menimbulkan penyakit. Bakteri *Escherichia coli* adalah bakteri hidup di dalam usus manusia dan hewan. Beberapa jenis tertentu seperti E.coli dapat menyebabkan infeksi usus serius yang mengakibatkan diare, sakit perut, dan demam (Paputungan dkk., 2019).

Staphylococcus aureus adalah bakteri gram positif. Sel-sel berbentuk bola, berdiameter 0,5 – 1,5 μm , terdapat dalam tunggal dan berpasangan dan secara khas membelah diri pada lebih dari satu bidang sehingga membentuk gerombolan yang tak teratur. Non motil, tidak diketahui adanya stadium istirahat. Dinding sel mengandung dua komponen utama yaitu peptidoglikan dan asam teikoat yang berkaitan dengannya. Kemoorganotrof, metabolisme dengan respirasi dan fermentatif. Anaerob fakultatif, tumbuh lebih cepat dan lebih banyak dalam keadaan aerobik. Suhu optimum 35 – 40⁰C. Terutama berasosiasi dengan kulit, dan selaput lendir hewan berdarah panas. Kisaran inangnya luas, dan banyak jalur merupakan patogen potensial (Lukman, 2016).



Gambar 5. Morfologi Bakteri *Staphylococcus aureus* (Sumber: Riskawati 2016).

Bakteri *Escherichia coli* merupakan kuman dari kelompok gram negatif, berbentuk batang dari pendek sampai kokus, saling terlepas antara satu dengan yang lainnya tetapi ada juga yang bergandeng dua-dua (diplobasil) dan ada juga yang bergandeng seperti rantai pendek, tidak membentuk spora maupun kapsula, berdiameter $\pm 1,1 - 1,5 \times 2,0 - 6,0 \mu\text{m}$, dapat bertahan hidup di medium sederhana. *Escherichia coli* dalam usus besar bersifat patogen apabila melebihi dari jumlah normalnya, bakteri ini menjadi patogen yang berbahaya bila hidup di luar usus seperti pada saluran kemih, yang dapat mengakibatkan peradangan selaput lendir (sistitis) (Dwidjoseputro, 1978).



Gambar 6. Morfologi Bakteri *Escherichia coli* (Sumber: Dwidjoseputro, 1978).

II.5 Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Bio-Autobiografi

Kromatografi Lapis Tipis adalah salah satu metode pemisahan kromatografi yang fleksibel dan banyak digunakan. Kromatografi lapis tipis (KLT) dan kromatografi kertas tergolong "kromatografi planar." KLT adalah metode kromatografi paling sederhana yang banyak digunakan. Peralatan dan bahan yang dibutuhkan untuk melaksanakan pemisahan dan analisis sampel dengan metode KLT cukup sederhana yaitu sebuah bejana tertutup (*chamber*) yang berisi pelarut dan lempeng KLT (Wulandari, 2011). Kromatografi lapis tipis ialah metode pemisahan fisikokimia. Lapisan pemisah terdiri atas bahan berbutir-butir (fase diam), ditempatkan pada penyangga berupa plat gelas, logam atau lapisan yang cocok (Fadila dkk., 2015). Prinsip Kromatografi Lapis Tipis yaitu pemisahan senyawa multi komponen dengan menggunakan dua fase yaitu fase diam dan fase gerak (Oktaviantari dkk., 2019). Perbandingan kecepatan pemindahan komponen dengan permukaan fasa mobile merupakan dasar untuk mengidentifikasi komponen-komponen yang dipisahkan dengan adanya metode kromatografi lapis tipis kita jadi mengetahui bagaimana cara mengidentifikasi asam amino melalui nilai R_f dari suatu asam amino (Sastrohamidjojo, 2013). Perhitungan nilai R_f didasarkan atas rumus (Oktaviantari dkk., 2019):

$$R_f = \frac{\text{Jarak titik pusat bercak dari titik awal}}{\text{Jarak Bercak}}$$

Bioautografi, berasal dari kata bio yang berarti makhluk hidup dan autografi berarti melakukan aktivitas sendiri. Bioautografi adalah suatu metode pendeteksian untuk menemukan suatu senyawa antimikroba yang belum teridentifikasi dengan

cara melokalisir aktivitas antimikroba tersebut pada suatu kromatogram. Metode ini memanfaatkan pengertian kromatografi lapis tipis (Paputungan dkk., 2019). Bioautografi merupakan teknik laboratorium untuk mendeteksi senyawa yang mempengaruhi laju pertumbuhan organisme uji dalam matrik (campuran dan kompleks). Metode tersebut didasarkan pada aktivitas biologi analit, yang dapat berupa antibakteri, antifungi, antitumor, antiprotozoa, dll (Isnaeni dkk., 2015). Dari kromatogram KLT dapat diketahui jumlah komponen dalam sampel yang ditotolkan berdasarkan jumlah noda (dengan penampak noda yang sesuai), sedang data bioautogram memberikan informasi jumlah komponen sampel yang memiliki aktivitas terhadap mikroba uji baik secara kualitatif maupun kuantitatif (Isnaeni, 2005). Prinsip bioautografi menggunakan metode difusi, besarnya daya hambat pertumbuhan bakteri pada metode difusi diperoleh dengan mengukur diameter zona hambat (Choma, 2005). Salah satu keuntungan metode bioautografi adalah selain untuk pemisahan dan identifikasi, juga dapat digunakan untuk mengetahui aktivitas biologis matrik yang kompleks secara langsung, terutama terkait dengan kemampuan suatu senyawa menghambat pertumbuhan mikroba (Rahalison, 1994).. Cara kerja bioautografi efisien dan efektif untuk determinasi antibiotik, serta relative murah dan mudah. Metode bioautografi menggunakan teknik KLT, sehingga sensitivitas metode tersebut lebih rendah dibandingkan metode kromatografi yang lain, dan memerlukan jumlah senyawa yang lebih banyak dalam analisis (Isnaeni dkk., 2015). Penggunaan metode KLT bioautofgrafi digunakan untuk penapisan senyawa antibiotik dengan meninjau bercak pada nilai Rf yang menghasilkan zona bening pada media (Syarifuddin dkk., 2019).