

**STUDI AKTIVITAS ANTIMIKROBA PROTEIN BIOAKTIF DARI
BAKTERI SIMBION SPONS *Petrosia alfiani***

WIRDA ASRIANI HAMJA

H31115507



**DEPARTEMEN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2020**



Optimization Software:
www.balesio.com

**STUDI AKTIVITAS ANTIMIKROBA PROTEIN BIOAKTIF DARI
BAKTERI SIMBION SPONS *Petrosia alfiani***

*Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat
untuk memperoleh gelar sarjana sains*

Oleh:

**WIRDA ASRIANI HAMJA
H31115507**



MAKASSAR

2020

SKRIPSI

**STUDI AKTIVITAS ANTIMIKROBA PROTEIN BIOAKTIF DARI
BAKTERI SIMBION SPONS *Petrosia alfiani***

Disusun dan diajukan oleh:

**WIRDA ASRIANI HAMJA
H31115507**

Skripsi ini telah diperiksa dan disetujui oleh:



Pembimbing Utama

Prof. Dr. Ahyar Ahmad. Ph.D
NIP. 19671231 199103 1 020



Pembimbing Pertama

Dr. Rosana Agus. M.si
NIP. 19650905 199103 2 00



Optimization Software:
www.balesio.com

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Wirda Asriani Hamja

Nomor Mahasiswa : H31115507

Program Studi : Kimia

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan skripsi ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 26 September 2020



WIRDA ASRIANI HAMJA



Optimization Software:
www.balesio.com

PRAKATA

Bismillahirrahmanirrahim, segala puji dan syukur kehadiran Allah yang telah memberikan rahmat, hidayah dan kemudahan yang selalu diberikan kepada hamba-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan judul “Studi Aktivitas Antimikroba Protein Bioaktif dari Bakteri Simbion Spons *Petrosia Alfiani*” sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Sains. Sholawat dan salam kepada Nabi besar Muhammad S.A.W.

Kepada kedua orang tua tercinta, ayahanda **Hamja**, dan ibunda **Hj. Nuraeni** terima kasih untuk setiap semangat, bantuan, kasih sayang dan doa yang senantiasa tak henti-hentinya diberikan kepada saya, semoga Allah senantiasa memberikan rahmat berupa kasih sayang, keteguhan hati di atas agama Allah, dan kemuliaan bukan hanya di dunia tapi juga di akhirat Insya Allah. Terima kasih juga kepada **Nenek Aji dan Kk Udi** yang telah membantu kuliah saya serta saudara-saudara saya **Nur Hikmah, Hasrida Nur, Muhammad Alwih Hamja dan Izza** yang selalu memberikan motivasi untuk saya, serta menjadi penyemangat bagi saya, semoga Allah senantiasa melindungi mereka di jalan kebenaran, Aamiin.

Penulis menyadari bahwa banyak pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan penulisan skripsi ini. Untuk itu, iringan doa dan ucapan terimakasih yang sebesar-besarnya penulis sampaikan kepada **Prof. Dr. Ahyar Ahmad, Ph.D,** dan **Dr. Rosana Agus, M.Si** selaku dosen

ing yang dengan penuh kesabaran, ketelatenan dan keikhlasan
-tengah kesibukannya meluangkan waktu untuk memberikan bimbingan
garahan dalam menyelesaikan penelitian ini.



Penulis juga tak lupa mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang sebesar-besarnya kepada:

1. Ayahanda **Dr. Eng Amiruddin, S.Si, M.Si** selaku dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin beserta semua staf pegawai.
2. Ketua Departemen Kimia Bapak **Dr. Abd. Karim, M.Si** dan Sekretaris Departemen Kimia Ibu **Dr. St. Fauziah, M.Si**, beserta dosen dan staf Departemen Kimia yang telah membantu penulis dalam perjalanan menyelesaikan pendidikan ini.
3. Dosen penguji ujian sarjana kimia, yaitu **Prof. Dr. Alfian Noor, M.Sc** selaku Ketua Tim Penguji, dan **Dr. Maming, M.Si** selaku Sekretaris Tim Penguji.
4. Seluruh **Analisis Laboratorium** di Departemen Kimia, terkhusus untuk **Kak Mahdalia, S.Si, M.Si** selaku analis Laboratorium Biokimia atas bantuan serta arahnya selama penelitian berlangsung. Terima kasih atas bantuan dan kerjasamanya.
5. Rekan partner penelitian **Eva Idriani** dan rekan penelitian biokimia **Faje, Ida, Cici, Ica, Uti, Enab, Mbak Lala, Fina, Cipa, Nelli, Anna, Atifah, Anita, Ono' dan Gunawan**. Terima kasih atas semangat, bantuan, penghibur dikala suka dan duka, serta memberikan warna dalam kehidupan Lab Biokimia.
6. Saudara-saudaraku di keluarga mandiri "Avengers Hijrah" **Cici, Novi, Enab, Faje, Fira, Ica, Ida, Irwan, Magets, Khae, Kholia, Putu, Sinar, Uti, Yani,**

Yogi. Terima kasih karena selalu ada sebagai penghibur dan semangat sampai pada tahap ini.



7. **Kak Akbar, Kak Asmi, Kak Yusri, Kak Rafsan, Kak Tika, Kak Nure, Kak Nabeela, dan Kak Deca**, yang selalu menjadi tempat bertanya dan berkeluh kesah selama proses penelitian berlangsung sampai terselesaikannya skripsi ini.
8. Teman-teman **Kimia 2015** yang merupakan saudara seperjuangan dalam menimba ilmu di jurusan kimia. Terkhusus saudara-saudariku **POLIHEDRA 2015**, terima kasih atas kebersamaan dan pengalaman, suka dan duka yang tak terlupakan “HMK Tempat kita di Bina, HMK Tempat kita di Tempa”.
9. Teman-teman KKN Lumpue Pare-pare, **Aya’, Aida, Maudy, Lisa, Jesi, Kak Irfan, Kak Affan, Kak Wawan, dan Kak Manaf**. Terima kasih atas kebersamaannya selama kurang lebih 40 hari.
10. Semua pihak yang telah banyak membantu penulis selama menyelesaikan penelitian, terima kasih.

Penulis sadar bahwa skripsi ini tidak sempurna dan banyak kekurangan baik materi maupun teknik penulisannya, karena sejatinya kesempurnaan hanyalah milik Allah SWT. Oleh karena itu, penulis berharap saran dan kritikan yang bersifat membangun dari pembaca, dan semoga dapat memberikan manfaat bagi siapa saja dalam pengembangan ilmu pengetahuan kimia khususnya bidang biokimia.

Makassar, 30 Juli 2020

Penulis



ABSTRAK

Spons salah satu biota laut penghasil senyawa-senyawa aktif yang dapat digunakan sebagai antimikroba. Bakteri yang bersimbiosis dengan spons kemungkinan besar menghasilkan zat bioaktif yang sama dengan inangnya. Tujuan dari penelitian ini adalah mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri simbiosis penghasil protein bioaktif dari spons *Petrosia alfiani* yang berpotensi sebagai antimikroba yang teridentifikasi sebagai *Enterobacter hafniae*. Protein ekstraseluler dan intraseluler diisolasi menggunakan metode fraksinasi amonium sulfat pada tingkat kejenuhan 0-20 %, 20-40 %, 40-60 % dan 60-80 %. Pemurnian protein dilakukan dengan cara dialisis menggunakan kantong selofan. Dilanjutkan dengan hidrolisis enzimatis. Uji aktivitas antimikroba dengan metode difusi agar menggunakan *paper disc*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak kasar, semua fraksi protein dan hidrolisat protein dari bakteri *Enterobacter hafniae* PA 8(5) simbiosis spons *Petrosia alfiani* yang diisolasi menunjukkan adanya senyawa protein bioaktif yang memiliki daya hambat terhadap pertumbuhan bakteri patogen *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Aktivitas antibakteri terbesar terdapat pada hidrolisat fraksi F3 protein intraseluler dengan daya hambat sebesar 18,6 mm terhadap bakteri *E. coli* dan daya hambat sebesar 15,9 mm terhadap bakteri *S. aureus* dan dikategorikan kuat.

Kata Kunci: Spons, Antimikroba, *Enterobacter hafniae*, Protein bioaktif



ABSTRACT

Sponge one of the marine biota that produces active compounds that can be used as antimicrobials. Bacteria that are symbiotic with a sponge are most likely to produce the same bioactive substances as their host. The purpose of this research is to isolate and identify the bioactive protein-producing symbiotic bacteria from the *Petrosia alfiani* sponge which has potential as an antimicrobial which is identified as *Enterobacter hafniae*. Extracellular and intracellular proteins are isolated using the ammonium sulfate fractionation method at saturation levels of 0-20%, 20-40%, 40-60% and 60-80%. Purification of protein is done by dialysis using cellophane bags. Followed by enzymatic hydrolysis. Test antimicrobial activity by diffusion method to use paper disc. The results showed that crude extracts, all protein fractions and protein hydrolyzate from bacteria *Enterobacter hafniae* PA 8(5) symbionts of isolated *Petrosia alfiani* sponges showed the presence of bioactive protein compounds that have inhibitory properties against pathogenic bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The greatest antibacterial activity was found in the F3 hydrolyzate of intracellular protein fraction with inhibition of 18.6 mm against *E. coli* bacteria and inhibition of 15.9 mm against *S. aureus* bacteria and categorized as strong.

keywords: Sponges, Antimicrobials, *Enterobacter hafniae*, Bioactive proteins



DAFTAR ISI

	Halaman
PRAKATA	iv
ABSTRAK.....	vii
ABSTRACT.....	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian	4
1.3.1 Maksud Penelitian	4
1.3.2 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Tinjauan Umum Spons	6
2.2 Tinjauan Spons <i>Petrosia alfiani</i>	10
2.2.1 Taksonomi.....	10
2.2.2 Morfologi.....	10
3 Tinjauan Umum Bakteri Symbion Spons	12
4 Tinjauan Umum Bahan Antimikroba.....	14



2.5	Tinjauan Umum Bakteri Uji...	17
2.5.1	<i>Escherichia coli</i>	17
2.5.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	18
2.6	Tinjauan Umum Teknik Isolasi dan Pemurnian Protein.....	19
2.6.1	Ekstraksi.....	19
2.6.2	Fraksinasi Dengan Salting out	19
2.6.3	Dialisis	20
2.7	Hidrolisis.....	20
2.8	Tinjauan Umum Uji Aktivitas Antimikroba	21
BAB III METODE PENELITIAN		25
3.1	Bahan Penelitian	25
3.2	Alat Penelitian	25
3.3	Waktu dan Tempat Penelitian	26
3.4	Prosedur Penelitian	26
3.4.1	Preparasi Sampel	26
3.4.2	Pembuatan Media	26
3.4.2.1	Media Nutrient Broth (NB)	26
3.4.2.2	Media Nutrient Agar (NA)	26
3.4.2.3	Media Muller-Hilton Agar (MHA)	27
3.4.2.4	Media Inokulum.....	27
3.4.2.5	Media Produksi.....	27
3.4.3	Penyegaran Sampel dalam Media Nutrient Broth	28
4.3.1	Bagian Permukaan Spons <i>Petrosia alfiani</i>	28
4.3.2	Bagian dalam Spons <i>Petrosia alfiani</i>	28



3.4.4	Isolasi Bakteri Symbion Penghasil Senyawa Antimikroba..	28
3.4.5	Seleksi Isolat Penghasil Senyawa Antimikroba	28
3.4.6	Identifikasi Isolat Penghasil Senyawa Antimikroba.....	29
3.4.7	Penentuan Waktu Produksi Optimum Protein Bioaktif	29
3.4.8	Produksi dan Ekstraksi Protein Bioaktif	30
3.4.9	Fraksinasi	31
3.4.10	Dialisis	32
3.4.11	Hidrolisis.....	32
3.4.12	Penentuan Derajat Hidrolisis.....	33
3.5	Penentuan Kadar Protein.....	33
3.6	Uji Antimikroba.....	34
3.6.1	Peremajaan Bakteri Uji	34
3.6.2	Pembuatan Suspensi Bakteri Uji	34
3.6.3	Pembuatan Larutan Kontrol	34
3.6.4	Pengujian Aktivitas Antimikroba	34
3.6.5	Pengumpulan dan Analisis Data.....	35
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....		36
4.1	Isolasi Bakteri Symbion Spons <i>Petrosia alfiani</i>	36
4.2	Seleksi Isolat Penghasil Senyawa Antimikroba.....	36
4.3	Identifikasi Isolat Penghasil Senyawa Antimikroba.....	38
4.4	Penentuan Waktu Produksi Optimum Protein Bioaktif.....	40
4.5	Produksi dan Ekstraksi Protein Bioaktif dari Isolat Bakteri Symbion <i>E. hafniae</i> PA (8)5.....	43
5	Pemurnian Protein Bioaktif.....	44



4.7	Hidrolisis Enzimatis.....	46
4.8	Uji Antimikroba Protein Bakteri <i>E. hafniae</i> PA (8)5.....	47
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN		
5.1	Kesimpulan.....	53
5.2	Saran.....	53
DAFTAR PUSTAKA		54
LAMPIRAN		61



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. <i>Sycon gelatinosum</i>	7
2. <i>Euplectella aspergillum</i>	7
3. <i>Microciona sp.</i>	8
4. <i>Petrosia alfiani</i>	11
5. Metode difusi silinder pipih pada pengujian antimikroba.....	22
6. Metode difusi kertas saring pada pengujian antimikroba.....	23
7. Metode dilusi pada penentuan MIC aktivitas antimikroba.....	24
8. Isolat bakteri PA 8(5) yang diisolasi dari bagian permukaan spons <i>Petrosia alfiani</i>	37
9. Pengaruh waktu fermentasi terhadap produksi protein ekstraseluler dan pertumbuhan bakteri <i>E. hafniae</i> PA(8)5.....	42
10. Pengaruh waktu fermentasi terhadap produksi protein intraseluler dan pertumbuhan bakteri <i>E. hafniae</i> PA(8)5.....	42
11. Persentase derajat hidrolisis hidrolisat protein bakteri <i>Enterobacter hafniae</i> Fraksi 1 dan Fraksi 3.....	47



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Senyawa bioaktif yang diisolasi dari spons Indonesia.....	9
2. Hasil identifikasi isolat bakteri simbion PA 8(5)	38
3. Distribusi kadar protein ekstraseluler dan intraseluler dari masing-masing fraksi pada beberapa tingkat kejenuhan ammonium sulfat.....	45
4. Diameter hambatan rata-rata dari ekstrak kasar, fraksi protein dan hidrolisat protein ekstraseluler dan intraseluler bakteri <i>E. hafniae</i> PA (8)5.....	48



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Diagram Alur Penelitian.....	61
2. Bagan Kerja Penyegaran Sampel dalam Media Nutrient Broth.....	62
3. Bagan Kerja Isolasi dan Identifikasi Bakteri Penghasil Senyawa Antimikroba.....	63
4. Bagan Kerja Ekstraksi Protein Bioaktif.....	66
5. Bagan Kerja Fraksinasi Protein Bioaktif dengan Amonium Sulfat.	67
6. Bagan Kerja Dialisis.....	68
7. Bagan Kerja Hidrolisis.....	69
8. Prosedur Penentuan Kadar Protein Sampel dengan Metode Lowry	70
9. Bagan Kerja Uji Antimikroba dengan Metode Difusi Agar.....	71
10. Penentuan Protein dengan Metode Lowry.....	72
11. Pembuatan Larutan Buffer Tris-HCl.....	73
12. Tabel Hasil ujiantang isolat bakteri simbiosis spons <i>Petrosia alfiani</i> terhadap <i>E. coli</i> dan <i>S. aureus</i>	75
13. Penentuan λ maksimum pada konsentrasi Bovin Serum Albumin 0,08 mg/mL.....	76
14. Kurva standar Bovin Serum Albumin pada λ 660 nm.....	77
15. Data hasil penentuan waktu produksi optimum protein dari bakteri <i>E. hafniae</i> PA (8)5 dan optical density (OD)	78
16. Konsentrasi protein pada sampel ekstrak kasar ekstraseluler (λ 660 nm)	79
17. Konsentrasi Protein pada Sampel Ekstrak Kasar Intraseluler (λ 660 nm).....	80
18. Pengaruh Konsentrasi Amonium Sulfat yang Ditambahkan pada Fraksinasi sebagai Tingkat Kejenuhan	81
19. Pengaruh Konsentrasi Amonium Sulfat pada Tingkat Kejenuhan Amonium Sulfat.....	82



20. Pengukuran Kadar Protein pada Setiap Tahap Pemurnian Fraksi Protein.....	83
21. Penentuan Total Protein pada Fraksinasi berbagai Tingkat Kejenuhan.....	84
22. Perhitungan Derajat Hidrolisis (DH)	85
23. Isolat Bakteri Penghasil Senyawa Antimikroba pada Pengenceran 10^{-8}	87
24. Hasil Pewarnaan Gram dan Uji Biokimia Sederhana dari Isolat PA (8)5... ..	88
25. Klasifikasi Bakteri <i>E. hafniae</i> PA(8)5.....	89
26. Uji Antibakteri Fraksi Protein <i>E. hafniae</i> PA (8)5.....	90
27. Uji Antibakteri Ekstrak Kasar dan Hidrolisat Protein <i>E. hafniae</i> PA (8)5.....	91
28. Dokumentasi.....	92



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit infeksi masih sering terjadi di Indonesia, hal ini didukung oleh kondisi wilayah yang bersuhu panas, lembab, dan basah sehingga sangat cocok untuk pertumbuhan dan perkembangan mikroba penyebab infeksi (Karim, 2018). Penyakit infeksi dapat disebabkan oleh mikroba patogen, seperti bakteri. Setiap tahun infeksi menyebabkan kematian pada 3,5 juta orang yang sebagian besar dari negara berpenghasilan rendah dan menengah (WHO, 2014).

Sejumlah bahan antimikroorganisme yang digunakan untuk menghambat kuman penyebab infeksi telah lama dikembangkan pada tingkat organisme, baik seluler maupun molekuler. Bahan antimikroorganisme tersebut dikenal dengan antibiotik (Pratiwi, 2017). Namun, penggunaan antibiotik yang tidak bijak menyebabkan munculnya permasalahan baru yaitu mikroba patogen resisten terhadap antibiotik misalnya *Escherichia coli* resisten terhadap berbagai jenis antibiotik yaitu ampicilin, kotrimoksazol, kloramfenikol, siprofloksasin, dan gentamisin (Lestari dkk., 2017).

Resistensi antibiotik baik secara klinis maupun ekonomi, dampaknya sangatlah besar dan menjadi kekhawatiran institusi kesehatan dari berbagai Negara. Apabila terjadi resistensi, antibiotik yang seharusnya efektif mengobati

infeksi menjadi tidak lagi efektif dan membutuhkan antibiotik dengan yang lebih baik dan umumnya memiliki harga yang lebih mahal kondisi memacu pencarian sumber bahan antimikroba baru yang dapat



menghambat dan membunuh bakteri-bakteri patogen (Krisnanta dkk., 2018).

Biota laut memiliki potensi yang sangat besar dalam menghasilkan senyawa-senyawa aktif yang dapat digunakan sebagai antimikroba. Sejak tahun 1980 perhatian dunia pengobatan mulai terarah ke biota laut yang diketahui dapat menghasilkan senyawa aktif salah satunya adalah spons (Ismet, 2007). Spons merupakan organisme laut yang memiliki potensi cukup besar dalam menghasilkan senyawa aktif. Di dunia diduga terdapat sekitar 10.000 spesies spons dan diperkirakan sekitar 200 spesies hidup di ekosistem terumbu karang Asia Tenggara. Spons dilaporkan memiliki aktivitas antikanker, antimikroba, dan antiparasit (Dahuri, 1998).

Genus *Petrosia* adalah salah satu kelompok spons yang memiliki beragam senyawa bioaktif, antara lain asam kortikatat sebagai antijamur dari spons *Petrosia corticata* (Soediro, 1999). Aktivitas antibakteri juga ditemukan pada hasil isolasi dari spons laut *Petrosia contignata*, yaitu *Taraxeron* dan *D-homoandrostan* (Sutedja dkk., 2005). Senyawa antibakteri epidioksi sterol dari spons laut *Petrosia nigrans* juga telah diisolasi dan dikarakterisasi dengan rumus molekul $C_{29}H_{48}O_3$ dengan nama 5,8-epidioksi-24etilkoolest-6-en-3-ol (Handayani dkk., 2011).

Spons *Petrosia alfiani* adalah spesies yang baru ditemukan dan endemik di kawasan perairan spermonde, diduga spons ini mengandung banyak metabolit sekunder yang berguna dan memungkinkan ditemukannya metabolit sekunder yang baru (Aminah dkk., 2014). Saat ini penelitian tidak hanya terfokus pada

tapi juga pada bakteri simbiosis spons. Penggunaan bakteri simbiosis dapat salah satu solusi agar tidak terjadi eksploitasi secara berlebihan pada tanaman spons. Menurut Yulianti dkk (2012), eksplorasi senyawa bioaktif



dari bakteri simbion lebih disukai karena beberapa kelebihan diantaranya bakteri mudah diisolasi dan dikultur dalam skala laboratorium, waktu pertumbuhan yang cepat dan dengan biaya yang lebih murah.

Beberapa bakteri laut telah dilaporkan menunjukkan aktivitas antimikroba, khususnya bakteri yang bersimbion dengan organisme lain. Menurut Nofiani (2008), bakteri tersebut memiliki kemampuan yang hampir sama dengan inangnya untuk menghasilkan senyawa bioaktif. Adanya interaksi secara biologis dengan senyawa bioaktif yang terdapat pada organisme tersebut memungkinkan bakteri untuk menghasilkan senyawa bioaktif yang sama.

Sejauh ini belum ada data penelitian mengenai isolasi protein bioaktif dari bakteri simbion *P. alfiani* sebagai bahan baku obat, khususnya sebagai bahan antimikroba. Penggunaan senyawa protein sebagai bahan obat memiliki beberapa keunggulan diantaranya dapat diterima baik oleh tubuh dan efek samping lebih sedikit. Oleh karenanya, perlu dilakukan penelitian mengenai protein bioaktif dari bakteri simbion spons *Petrosia alfiani* dan uji aktivitasnya sebagai antimikroba. Dalam penelitian ini dilakukan isolasi dan karakterisasi bakteri simbion spons *Petrosia alfiani* penghasil senyawa antimikroba. Isolat yang memiliki aktivitas tertinggi kemudian dikultur dalam media kultur termodifikasi untuk produksi protein bioaktif dan dilakukan ekstraksi, fraksinasi, dan dialisis. Fraksi dengan kadar protein tertinggi selanjutnya dihidrolisis. Protein terhidrolisis terdiri atas senyawa-senyawa yang lebih sederhana seperti peptida, asam amino, dan amonia sehingga mudah diserap oleh tubuh. Proses hidrolisis yang sering digunakan adalah secara enzimatis. Hidrolisis protein dengan menggunakan enzim lebih menguntungkan daripada menggunakan asam atau basa pada flavor enhancer. Hidrolisis secara enzimatis akan menghasilkan



hidrolisat protein yang terhindar dari kerusakan asam-asam amino, seperti triptofan dan glutamin. Aktivitas antimikroba protein bioaktif diuji dengan metode difusi agar.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. apakah ada isolat bakteri simbion spons *Petrosia alfiani* yang berpotensi sebagai antimikroba?
2. apakah isolat bakteri simbion spons *Petrosia alfiani* mengandung senyawa protein bioaktif?
3. bagaimana aktivitas antimikroba fraksi protein dari isolat bakteri spons *Petrosia alfiani*?
4. bagaimana aktivitas antimikroba hidrolisat protein fraksi protein tertinggi dari isolat bakteri spons *Petrosia alfiani*?

1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian

1.3.1 Maksud Penelitian

Penelitian ini dimaksudkan untuk mengetahui daya hambat protein bioaktif dari bakteri simbion spons *Petrosia alfiani* terhadap bakteri uji (*Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*).

1.3.2 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk:

1. mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri simbion spons *Petrosia alfiani*
2. menguji kemampuan protein bioaktif yang berpotensi sebagai antimikroba pada media kultur termodifikasi.



2. mengisolasi protein bioaktif dari isolat bakteri yang memiliki aktivitas antimikroba terbesar.
3. menentukan fraksi protein yang memiliki aktivitas antimikroba untuk menghambat pertumbuhan bakteri uji (*Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*).
4. menentukan aktivitas antimikroba hidrolisat protein fraksi protein tertinggi dari isolat bakteri spons *Petrosia alfiani* terhadap bakteri uji (*Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*)

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang diharapkan dari penelitian ini adalah memberikan informasi mengenai fraksi protein bioaktif dari bakteri simbiosis spons *Petrosia alfiani* yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri secara optimal dan efektif, sehingga dapat dikembangkan sebagai bahan dasar obat antimikroba yang baru.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Umum Spons

Sponge atau porifera termasuk hewan yang hidup menetap pada suatu habitat pasir, batu-batuan atau juga pada karang-karang mati di dalam laut (Rizka, 2013). Salah satu hewan dari filum porifera dan merupakan invertebrata laut yang hidup pada ekosistem terumbu karang (Suryati, 2000). Dalam mencari makan, hewan ini aktif mengisap dan menyaring air melalui seluruh permukaan tubuhnya. Pada umumnya, spons mampu memompa air rata-rata sebanyak 10 kali volume tubuhnya dalam waktu satu menit, sehingga tidak salah kalau hewan ini terkenal sebagai hewan filter feeder yang paling efisien dibandingkan hewan laut lainnya (Bergquist, 1978).

Terdapat sekitar 5000 jenis spons di dunia. Sebarannya sangat luas, spons bahkan dapat dijumpai di bawah tutupan es dari kutub selatan. Kelompok hewan ini mempunyai banyak pori-pori dan saluran-saluran. Spons dewasa biasanya hidup menetap sedangkan spons muda bergerak aktif dan terbawa arus sebelum mereka menempel (Romimohtarto dan Juwana, 1999; Fitrianto, 2009).

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

1. Kelas Calcarea atau Calcispongiae

Merupakan sponge yang hidup di daerah pantai yang dangkal, bentuk tubuhnya sederhana. Spikula sponge ini tersusun dari kalsium karbonat dan tidak mengandung spongin. Sebagian besar sponge dari kelas ini bentuknya kecil-kecil warna putih keabu-abuan dan ada beberapa jenis berwarna kuning, merah



jambu dan hijau. Elemen kerangka dari calcarea berbentuk spikula “triaxon” dan tidak ada perbedaan megasklera dan mikrosklera. Beberapa jenis sponge ini adalah *Sycon gelatinosum* (berbentuk selinder berwarna coklat muda) (Gambar 1).



Gambar 1. *Sycon gelatinosum* (Pratama, 2014)

2. Kelas Hexactinellida atau Hyalospongiae

Kelas Hexactinellida atau Hyalospongiae merupakan sponge yang hidup di daerah dalam dengan kedalaman 50 meter bahkan ada yang dapat tumbuh hingga 1 meter. Disebut juga sponge gelas. Spikula terdiri dari silikat dan tidak mengandung spongin. Spikulanya berbentuk bidang “triaxon”, dimana masing-masing bidang terdapat dua jari-jari (Hexactinal). Sponge dari kelas ini belum banyak dikenal, karena sulit didapatkan. Contoh sponge ini adalah *Euplectella sp* dan *Aspergillum sp* (Gambar 2). Terdiri dari 2 ordo yaitu : Ordo *Hexastorophora* dan Ordo *Amphidiscophora*.



Gambar 2. *Euplectella aspergillum* (Pratama, 2014)



3. Kelas Demospongiae

Demospongiae adalah kelompok spons yang paling dominan diantara filum porifera. Seluruh Demospongiae memiliki saluran air tipe leukonoid. Mereka tersebar luas di alam, jumlah jenis maupun organismenya sangat banyak. Habitat Demospongiae umumnya di laut dalam maupun dangkal, meskipun ada yang di air tawar (Pechenik, 1991).

Demospongiae berbentuk massif dan berwarna cerah dengan sistem saluran yang rumit, dihubungkan dengan kamar-kamar bercambuk kecil yang bundar. Tubuh spons ini berwarna cerah karena mengandung pigmen yang terdapat pada amoebosit. Fungsi warna diduga untuk melindungi tubuhnya dari sinar matahari. Spikulanya ada yang terdiri dari silikat berbentuk monoaxon, teraxon, dan ada beberapa ordo yaitu Dictyoceratida, Dendrocertida dan Verongida spikulanya hanya terdiri serat sponging, serat kolagen atau spikulanya tidak ada. Bentuk tubuh spons ini tidak beraturan dan bercabang (Sari, 2016).



Gambar 3. *Microciona sp.* (Pratama, 2014)

Spons diduga mengandung senyawa peptida, glikosida, saponin, steroid, asam fenolik dan squalen serta turunannya yang dihasilkan dari metabolit. Spons juga kaya akan senyawa kimia seperti keratin, asam amino bebas, asam lemak, brominat phenol, derivat senyawa dibromotyrosine dan



bromopyrol. Spons yang telah berhasil dipisahkan komponen bioaktifnya mengandung sterol yang telah diidentifikasi dari spons seperti elianasterol, poriferasterol dan chondrillasterol (Ralph, 1998). Beberapa senyawa bioaktif yang diisolasi dari spons Indonesia dapat dilihat pada Tabel 1 dibawah ini.

Tabel 1. Senyawa bioaktif yang diisolasi dari spons Indonesia (Rachmat, 2008)

Lead Compound	Aktivitas	Biota Asal
Aaptamine	Sitotoksik	<i>Aaptos aaptos</i>
Barangamide	Sitotoksik	<i>Theonella swinhoei</i>
Bitungolide A-F	Sitotoksik	<i>Theonella swinhoei</i>
Brianthein A Antibakteri	Sitotoksik	<i>Brianthein exvacatum</i>
Demethyl aaptamin	Sitotoksik	<i>Aaptos aaptos</i>
Isomisakinolide	Sitotoksik	<i>Theonella swinhoei</i>
Jaspamide	Sitotoksik	<i>Jaspis splendens</i>
Lembehyne A	MDR	<i>Haliclonia sp</i>
Luteoresin	Sitotoksik	<i>Chaelonaphysilla sp</i>
Mcfarlandin	Sitotoksik	<i>Chaelonaphysilla sp</i>
Melophlin A dan B	Sitotoksik	<i>Meloplus sarassinorum</i>
Methyl scardycin B New	Sitotoksik	<i>Carteriospongia foliascens</i>
sesterpenes	Sitotoksik	<i>Phyllospongia sp</i>
Sarasinoside A	Sitotoksik	<i>Meloplus sarassinorum</i>
Scardycin	Sitotoksik	<i>Carteriospongia foliascens</i>
Swinholide A	Sitotoksik	<i>Theonella swinhoei</i>
Theonella peptolide	Sitotoksik	<i>Theonella swinhoei</i>
Xestoquinone	Sitotoksik	<i>Xestospongia sp</i>

Spons merupakan *bioprospecting*. Banyaknya faktor dari spesies spons

kimia baru yang ditemukan, manfaat tersebut antara lain adalah sebagai anti-inflamasi, antimikroba, antijamur, antitumor, antivirus, antifouling, dan



menghambat aktivitas enzim. Beberapa jenis spons telah digunakan untuk spons mandi sejak beberapa abad yang lalu. Hal ini dapat diketahui melalui tulisan Homer dan beberapa penulis lain yang berasal dari jaman Yunani kuno (Brusca dan Brusca, 1990).

2.2 Tinjauan Umum Spons *Petrosia Alfiani*

2.2.1 Taksonomi

Klasifikasi spesies spons yang menjadi objek penelitian ini adalah sebagai berikut (de Voogd dan Van Soest, 2002):

Kingdom	: <i>Animalia</i>
Phylum	: <i>Porifera</i>
Class	: <i>Demospongiae</i>
Subclass	: <i>Heteroscleromorpha</i>
Order	: <i>Haplosclerida</i>
Family	: <i>Petrosiidae</i>
Genus	: <i>Petrosia</i>
Species	: <i>Petrosia alfiani</i>

2.2.2 Morfologi

Morfologi luar spons laut sangat dipengaruhi oleh faktor fisika, kimiawi, dan biologis lingkungannya. Spesimen yang berada di lingkungan yang terbuka dan berombak besar cenderung pendek pertumbuhannya atau juga merambat. Sebaliknya spesimen dari jenis yang sama pada lingkungan yang terlindungi atau

perairan yang lebih dalam dan berarus tenang, pertumbuhannya cenderung lebih tinggi. Pada perairan yang lebih dalam spons cenderung memiliki tubuh



yang simetris dan lebih besar sebagai akibat dari lingkungan yang lebih stabil apabila dibandingkan dengan jenis yang sama pada perairan yang dangkal (de Voogd dan Van Soest, 2002).

Spons *Petrosia alfiani* memiliki bentuk seperti lengan yang besar, bundar, atau tebal dari panjang maksimum 20 cm, lebar 10 cm, dan tinggi 4 cm. Banyak sekali oscules tersebar diseluruh tubuh spons, dengan diameter 2-6 mm. Permukaannya halus dan diselimuti rambut halus yang kaku dan pendek. Tekstur bervariasi dari keras seperti batu ke sedikit lunak. Warna kuning kenari cerah, berubah menjadi merah ceri jika terpapar udara. Spons ini hidup di lereng terumbu karang, dari perairan dangkal hingga kedalaman 40 m. Tumbuh di blok karang dan puing-puing atau pasir karang. Spons ini endemik di kawasan perairan Spermonde Sulawesi Selatan. Spesies ini dinamai menurut Prof. Dr. Alfian Noor. Dia adalah Koordinator Program Buginesia dan Kepala Laboratorium Kimia Radiasi Universitas Hasanuddin, Makassar. Morfologi spons *Petrosia alfiani* dapat dilihat pada Gambar 4 (de Voogd dan Van Soest, 2002).



4. Morfologi dari spons *Petrosia Alfiani* (Voogd dan Van Soest, 2002)



2.3 Tinjauan Umum Bakteri Simbion Spons

Bakteri laut memiliki kecenderungan untuk berasosiasi atau bersimbiosis dengan suatu lapisan permukaan padat. Mikroorganisme laut seperti halnya makhluk hidup lainnya sangat dipengaruhi oleh faktor-faktor abiotik (sifat fisik dan kimia) lingkungan sekitarnya. Faktor tersebut tidak saja mempengaruhi keberadaan suatu jenis mikroba dalam laut, tetapi juga mempengaruhi pertumbuhan, perbanyakan, dan kegiatan-kegiatan yang penting bagi organisme yang lain. Faktor-faktor abiotik tersebut antara lain suhu, tekanan hidrostatik, salinitas, derajat keasaman (pH), keberadaan oksigen, nitrat dan fosfat, bahan organik total, tekanan osmosis, dan faktor nutrisi (Lisdayanti, 2013).

Spons adalah hewan berpori yang termasuk filter feeder yaitu hewan yang memiliki cara makan dengan cara menyaring air laut yang mengandung makanan melalui pori-pori (ostium). Mikroba selain sebagai makanan juga dijadikan simbion dari spons karena mikroba memakai tubuh dari spons yang berpori-pori sebagai inangnya untuk tempat hidup dan perlindungan (Taylor dkk., 2007).

Mikroba yang bersimbiosis dengan spons kemungkinan besar banyak melakukan interaksi biokimia dengan inangnya. Interaksi biokimia tersebut memungkinkan mikroba simbion menghasilkan zat bioaktif yang sama dengan inangnya (Nofiani dkk., 2009). Kemampuan mikroba yang berasosiasi dengan spons dalam menghambat pertumbuhan mikroba target, merupakan bentuk

antagonis yang diduga dilakukan dengan menghasilkan kandungan bioaktif yang bersifat antimikroba. Biosintesis senyawa antimikroba



berperan penting dalam proses pelekatan, kolonisasi target hingga kompetisi dalam mendapatkan ruang dan nutrisi dengan mikroba lainnya (Lee dkk., 2001).

Interaksi antara spons dan bakteri terjadi dalam bentuk simbiosis komensalisme dalam menghasilkan senyawa bioaktif. Metabolit bakteri yang berasosiasi dengan invertebrata laut memiliki kemiripan struktur dengan metabolit yang dihasilkan oleh inangnya. Beberapa aktivitas yang ditunjukkan oleh bakteri asosiasi spons antara lain *Vibrio spp.* yang berasosiasi dengan spons *Dysidea sp.* menunjukkan adanya sintesis sitotoksik dan antibakteri tetrabromodiphenyl eter. Asosiasi antara *Micrococcus* dengan spons *Tedania ignis* ditemukan adanya aktivitas antimikroba (Kanagasabhapathy dkk., 2005; Rini, 2017).

Penelitian Abubakar dkk (2011) diketahui bahwa sebanyak 32 isolat (45,71%) dari bagian mesohyl (sisi dalam tubuh spons) dan 20 isolat (29,41%) dari bagian permukaan *Jaspis sp.* menunjukkan kemampuan antimikroba yaitu menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus*, *V. harveyi*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, EPEC K-11, *Candida albicans* dan *C. tropicalis*. Isolat bakteri endofit (dari mesohyl) dan permukaan tersebut menunjukkan aktivitas antimikroba yang baik karena mampu menghambat pertumbuhan minimal tiga mikroba target dengan kemampuan penghambatan yang baik. Sunny dkk (2016) melaporkan bahwa simbiosis spons dari selat Makassar memiliki kemampuan antimikroba terhadap bakteri *S. aureus*. Dua isolat bakteri yang berasosiasi dengan spons yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus*, yaitu S.5-8 dan

BC dengan masing-masing diameter zona hambat 1,5 dan 2,6 mm.

Hasil penelitian Selvin dan Lipton (2004) bahwa metabolit sekunder dari



spons laut *Dendrilla nigra* dapat digunakan untuk mengontrol bakteri patogen pada udang *Penaeus monodon*. Pemberian dalam bentuk formulasi pakan dengan metabolit sekunder *D. nigra* memberikan proteksi 100% terhadap *V. harveyi* dan *V. alginolyticus*. Metabolit sekunder dari spons laut jenis *Acanthella elongata*, *Axinella donnani*, *C. diffusa*, *C. subarmigera* dan *Echinodictyum gorgonoides* diketahui mempunyai aktifitas antibakteri karena mampu menghambat bakteri patogen ikan dan udang yaitu *Aeromonas hydrophila*, *P. aeruginosa*, *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. fischeri*, *V. fluvialis*, *V. pelagius*, dan *V. vulnificus* (Sonia dkk., 2008). Ekstrak bakteri simbiosis dari spons *Theonella sp.*, *Aaptos sp.*, *Melophlus sarassinorum*, *Callyspongia sp.*, *Ircinia sp.*, *Stylissa flabeliformes*, *Lisoclinum sp.* dan *Clathria sp.* asal Barrang Lompo Makassar juga berpotensi mengandung substansi aktif antibakteri patogen *S. aureus*, *B. subtilis* dan *V. eltor* (Murniasih dan Rasyid, 2010).

2.4 Tinjauan Umum Bahan Antimikroba

Antimikroba adalah bahan-bahan atau obat-obatan yang digunakan untuk memberantas infeksi oleh mikroorganisme pada manusia. Antimikroba biasa diistilahkan sebagai antibiotik. Istilah antibiotik berasal dari kata antibiosis yang berarti substansi yang dihasilkan oleh suatu mikroorganisme yang dalam jumlah kecil dapat menghambat pertumbuhan atau mematikan mikroorganisme lain.

Penemuan antibiotik diawali oleh Alexander Fleming pada tahun 1928 yang

menemukan adanya penghambatan pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada cawan petri oleh kontaminan yang akhirnya dikenal dengan *Penicillium notatum*. Zat aktif yang kemudian diisolasi dari *Penicillium notatum* ini diberi



nama penicillin (Setyaningsih, 2004).

Berdasarkan mekanisme kerjanya, antimikroba dapat dibagi dalam lima kelompok, yaitu: 1) yang menghambat sintesis dinding sel mikroba; 2) yang mengganggu keutuhan membran sel mikroba; 3) yang menghambat metabolisme sel mikroba; 4) yang menghambat sintesis protein sel mikroba; dan 5) yang menghambat sintesis asam nukleat sel mikroba (Djide dkk., 2004).

Senyawa antibiotik dapat dikelompokkan berdasarkan kelarutannya, basis bahan kimia alami, basis struktur kimia, maupun toksisitasnya terhadap animalia. Berdasarkan kelarutannya, senyawa antibiotik dapat dibagi atas (Karim, 2018):

1. Grup A. Larut dalam air dengan reaksi berbeda-beda, dan tidak larut dalam eter. Senyawa ini biasanya berbasis protein, basa organik, atau senyawa pengadsorpsi pada molekul protein. Contohnya: aktinomisetin, streptomisin, penatin, dan piosianin.
2. Grup B. Larut dalam eter dan dalam air dengan reaksi tertentu. Contoh: penisilin, flavisin, sitrinin, asam penisilat, proaktinomisin.
3. Grup C. Tidak larut dalam air dan eter, meliputi gramisidin, tirosidin, subtilin, dan simplesin.
4. Grup D. Larut dalam eter dan tidak larut dalam air. Contoh: fumigasin, fumigatin, gliotoksin, actinomisin, piosianase, dan lain-lain.

Berdasarkan basis bahan kimia alami penyusunnya, senyawa antibiotik dapat dibagi atas:



dan berbagai ekstrak mikrobial yang diperoleh dengan pelarut organik, pyocyanase, asam piolipik, dan lain-lain.

2. Pigmen, yaitu piosianin, hemipiosianin, prodigiosin, fumigatin, klororafin, toksoflavin, aktinomisin, litmosidin, dan lain-lain.
3. Polipeptida, terdiri dari tirotrisin, gramisidin, tirosidin, kolisin, subtilin, basilin, dan aktinomisetin.
4. Senyawa mengandung sulfur, yakni berbagai jenis penisilin, gliotoksin, dan chaetomin.
5. Kuinon dan keton, yaitu sitrinin, spinulosin, klavasin, dan asam penisilat.
6. Basa organik, meliputi streptomisin, streptotrisin, dan proaktinomisin.

Antibiotik yang diklasifikasikan berdasarkan struktur kimianya yaitu sebagai berikut:

1. Senyawa mengandung C, H, dan O saja

Contoh: klavasin ($C_7H_6O_4$), fumigatin ($C_8H_8O_4$), asam penisilat ($C_8H_{10}O_4$), sitrinin ($C_{13}H_{14}O_5$), fumigasin ($C_{32}H_{44}O_8$), dan lain-lain.

2. Senyawa mengandung C, H, O, dan N

Contoh: iodinin ($C_{12}H_{20}O_4N_2$), streptomisin ($C_{21}H_{37-39}O_{12}N_2$), aktinomisin ($C_{41}H_{56}O_{11}N_8$), gramisidin, tirosidin, dan lain-lain.

3. Senyawa mengandung C, H, O, N, dan S

Contoh: penisilin ($C_9H_{11}O_4SN_2.R$), gliotoksin ($C_{13}H_{14}O_4N_2S_2$)

4. Senyawa lainnya yang belum teridentifikasi secara penuh.

Contoh: ustin ($C_{19}H_{15}O_5C_{13}$)

Berdasarkan toksisitasnya terhadap animalia, senyawa antibiotik dapat

menjadi:

Senyawa nontoksik atau sedikit toksik, meliputi penisilin, streptomisin, poliporin, dan aktinomisetin.



2. Senyawa dengan toksisitas terbatas, termasuk gramisidin, tirosidin, sitrinin, streptotrisin, dan fumigasin.
3. Senyawa toksisitas tinggi, seperti aktinomisin, gliotoksin, asam aspergilat, dan klavasin.

2.5 Tinjauan Umum Bakteri Uji

2.5.1 *Escherichia coli*

Kedudukan *Escherichia coli* dalam mikrobiologi (Hudault dkk., 2001):

Kingdom	: <i>Eubacteria</i>
Phylum	: <i>Proteobacteria</i>
Class	: <i>Gammaproteobacteria</i>
Order	: <i>Enterobacteriales</i>
Family	: <i>Enterobacteriaceae</i>
Genus	: <i>Escherichia</i>
Species	: <i>E. Coli</i>
Nama Binomial	: <i>Escherichia coli</i>

Bakteri *Escherichia coli* adalah bakteri gram negatif, anaerobik fakultatif berbentuk batang yang umumnya ditemukan di usus besar makhluk berdarah panas. Umumnya, strain dari *E. Coli* tidak berbahaya, tetapi beberapa serotip dapat menyebabkan keracunan makanan yang serius dan penarikan produk makanan karena terkontaminasi bakteri ini. Strain yang tidak berbahaya

flora normal dari usus dan bermanfaat untuk produksi vitamin K₂ (Meganathan, 1982) dan menghambat bakteri patogen pada usus (Hudault dkk., 2001).



Escherichia coli berbentuk batang lurus, 1,1 – 1,5 μm x 2,0 – 6,0 μm , motil dengan flagellum peritrikum atau non motil. Tumbuh dengan mudah pada medium nutrisi sederhana. Laktosa difermentasi oleh sebagian besar galur dengan produksi asam dan gas (Pelczar, 2008).

2.5.2 *Staphylococcus aureus*

Kedudukan *S. Aureus* dalam mikrobiologi (Hill, 1981):

Kingdom : *Eubacteria*
Phylum : *Firmicutes*
Class : *Coccus*
Order : *Bacillales*
Family : *Staphylococcaceae*
Genus : *Staphylococcus*
Species : *S. Aureus*
Nama binomial : *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus adalah bakteri gram positif anaerobik fakultatif berbentuk bulat yang juga dikenal dengan nama “staph emas”, memiliki ukuran 0,7-1,2 μm . Bakteri ini tumbuh optimal pada suhu 37 °C dan berkelompok seperti buah anggur dan memiliki warna berwarna emas pada agar darah. *Staphylococcus aureus* bereproduksi dengan cara pembelahan biner. Dua sel anakan tidak terpisah secara sempurna sehingga bakteri ini selalu terlihat membentuk koloni kluster seperti anggur. Bersifat flora normal pada kulit sehat, tetapi dapat menjadi patogen pada jaringan kulit yang terbuka. *Staphylococcus aureus* hidup sebagai

di dalam saluran pengeluaran lendir dari tubuh manusia dan hewan-hewan
dung, mulut dan tenggorokan dan dapat dikeluarkan pada waktu batuk



atau bersin. Bakteri ini sering terdapat pada pori-pori dan permukaan kulit, kelenjar keringat dan saluran usus (Brooks dkk., 2007).

2.6 Tinjauan Umum Teknik Isolasi dan Pemurnian Protein

Dasar dari pemisahan ini adalah memisahkan protein dari semua protein lain yang tidak diperlukan yang semuanya berada pada material yang sama. Secara umum isolasi protein dapat digolongkan dalam tiga tahapan yaitu ekstraksi, fraksinasi dengan *salting out* dan dialisis (Dennison, 2002).

2.6.1 Ekstraksi

Tahap awal dari pemurnian adalah mengisolasi protein dari sumber yang memproduksinya, baik sel tanaman, hewan, maupun mikroorganisme. Protein ekstraseluler yang disekresikan ke dalam medium diperoleh melalui pemisahan sel dari media fermentasi dengan teknik filtrasi dan sentrifugasi. Protein target berada dalam medium bebas sel yang biasanya dalam bentuk yang sangat encer. Sedangkan untuk protein intraseluler, sel dipanen dan diresuspensi dalam larutan dapar (*buffer*) atau air kemudian dipecahkan agar dapat diambil proteinnya (Ellyasheva & Rachman, 2005; Sugiyono dan Noviendri, 2006).

2.6.2 Fraksinasi Dengan *Salting out*

Metode yang paling banyak dipakai adalah fraksinasi dengan menggunakan konsentrasi garam yang tinggi disebut *salting-out* (Scopes, 1994; Akbar, 2017). Pada penambahan garam dengan konsentrasi tertentu kelarutan

menurun. Molekul air yang berikatan dengan garam-garam semakin banyak yang menyebabkan penarikan selubung air yang mengelilingi permukaan



protein. Peristiwa ini menyebabkan protein saling berinteraksi, beragregasi kemudian mengendap (Harris, 1989).

Garam yang sering di gunakan yaitu amonium sulfat. Fraksi menggunakan amonium sulfat menghasilkan protein yang mengandung kadar garam yang tinggi. Amonium sulfat yang terkandung dalam protein dapat dihilangkan dengan cara dialisis enzim (Mayasari, 2016).

2.6.3 Dialisis

Dialisis merupakan proses untuk menghilangkan ion-ion pengganggu yang dapat mengganggu kestabilan protein. Proses ini bertujuan untuk menghilangkan garam dan zat terlarut lainnya yang mempunyai berat molekul yang lebih rendah daripada protein enzim. Prinsip dialisis yaitu memisahkan molekul-molekul yang besar dari molekul yang kecil dengan bantuan membran semipermeabel. Dialisis dapat dilakukan dengan menggunakan kantong selofan, kantong ini memiliki ukuran pori-pori yang lebih kecil dari ukuran protein sehingga protein tidak dapat keluar dari kantong selofan (Kristanti, 2001).

2.7 Hidrolisis

Hidrolisis diartikan sebagai pemecahan banyak ikatan menjadi ikatan lebih kecil dan sederhana (Kirk dan Othmer 1953). Pada hidrolisis, sebuah ikatan antara dua atom dipecah. Menurut Dian 2008, reaksi hidrolisis protein dapat dibagi dalam beberapa tipe, yaitu :

a) Hidrolisis murni, hanya air yang digunakan untuk proses hidrolisis

isis dengan larutan asam

isis dengan larutan alkali



d) Hidrolisis dengan peleburan alkali yang menggunakan air atau tanpa air pada suhu tinggi

e) Hidrolisis dengan enzim sebagai katalisator

Hidrolisis protein secara enzimatis memiliki kelebihan dibandingkan hidrolisis protein dengan asam dan alkali karena produk peptida yang dihasilkan memiliki komposisi dan urutan asam amino yang spesifik sesuai dengan jenis protease yang digunakan. Selain itu, hidrolisis protein secara enzimatis berlangsung pada kondisi yang lebih *mild* (tidak pada kondisi ekstrim) dibandingkan menggunakan asam atau basa sehingga tidak merusak asam amino yang dihasilkan. Hidrolisis enzim dapat menghasilkan produk hidrolisat yang terhindar dari perubahan dan kerusakan produk yang bersifat non hidrolitik (Whitaker, 2003; Pardo *dkk.*, 2000). Hidrolisat protein merupakan sumber protein alami yang dihidrolisis sehingga lebih mudah diasimilasi oleh makhluk hidup. Hidrolisis secara parsial mampu memecah molekul protein menjadi beberapa gugus amino maupun peptida melalui pemutusan ikatan rantai peptida (Rehm dan Reed, 1995).

Hidrolisis protein dipengaruhi oleh konsentrasi bahan-bahan penghidrolisis, suhu, dan waktu hidrolisis serta tekanan udara (Dian 2008). Untuk meningkatkan aktivitas hidrolisis, maka dapat digunakan enzim-enzim proteolitik komersial (Syahrizal 1991). Salah satunya adalah pepsin, merupakan enzim yang akan mencerna protein dengan memecah protein menjadi bagian-bagian yang lebih kecil (Bunnel, 1999).



uan Umum Uji Aktivitas Antimikroba

ikenal beberapa cara pemeriksaan dan pengujian secara mikrobiologi

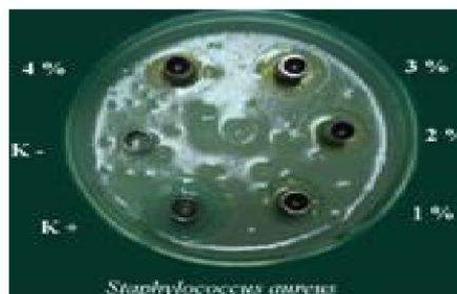
terhadap kemampuan antimikroba dari bahan-bahan kemoterapeutika seperti antibiotik. Uji aktivitas mikroba bisa dilakukan secara *in vitro* maupun secara *in vivo*. Pengukuran aktivitas antimikroba secara *in vitro* dilakukan untuk menentukan potensi agen antimikroba dalam larutan, konsentrasinya dalam tubuh atau jaringan, dan kepekaan mikroorganisme terhadap obat yang diketahui. Secara umum pengujian antimikroba secara *in vitro* dapat dilakukan dengan dua cara yaitu metode difusi dan metode dilusi (Brooks, dkk., 2005; Lay, 1994) :

1. Metode difusi (penyerapan)

Metode yang paling sering digunakan adalah metode difusi agar. Pada metode ini kemampuan antimikroba ditentukan berdasarkan hambatan yang terjadi. Beberapa modifikasi metode ini adalah:

a. Metode difusi dengan silinder pipih

Cara ini didasarkan atas perbandingan antara luas daerah hambatan yang dibentuk larutan contoh terhadap pertumbuhan mikroba dengan daerah hambatan yang dibentuk larutan pembanding. Pada cara ini digunakan plat silinder yang diletakkan pada media kemudian larutan contoh dimasukkan ke dalamnya. Silinder yang digunakan adalah *stainless steel* tahan karat atau porselin. Metode difusi silinder pipih dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Metode difusi silinder pipih pada pengujian antimikroba (Karim, 2018)

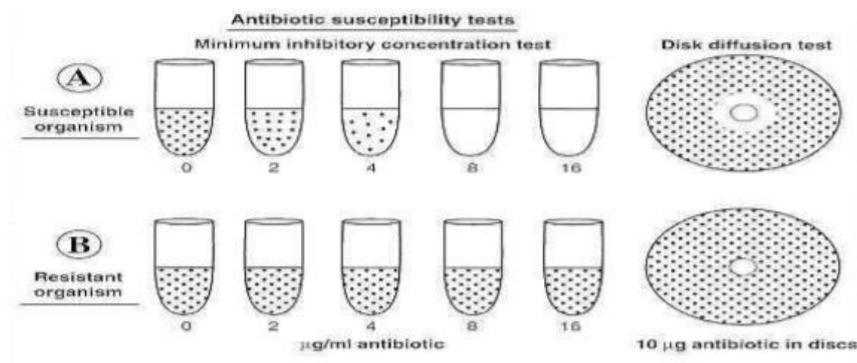


b. Metode difusi mangkuk pipih

Prinsip kerjanya sama dengan plat silinder. Perbedaannya disini adalah menggunakan alat berupa “cup plate” yaitu lubang atau semacam mangkok yang diletakkan langsung pada medium.

c. Metode difusi dengan kertas saring atau Kirby-Bauer

Uji ini diperkenalkan oleh William Kirby dan Alfred Bauer tahun 1966. Cara ini menggunakan kertas saring dengan garis tengah 0,7-1 cm, yang nantinya dicelupkan ke dalam larutan pembanding. Penghambatan pertumbuhan mikroba terlihat sebagai wilayah jernih di sekitar pertumbuhan mikroba. Metode difusi kertas saring dapat dilihat pada Gambar 6.

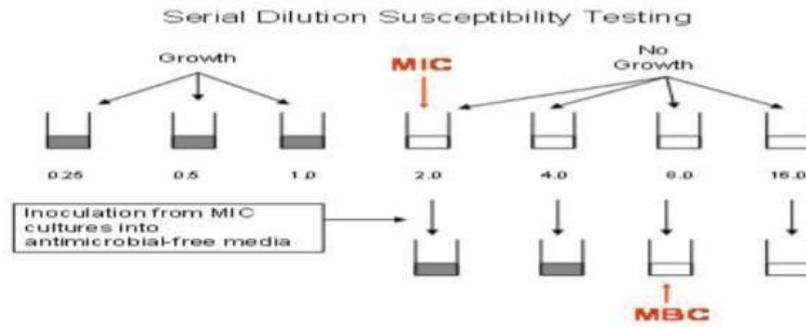


Gambar 6. Metode difusi kertas saring pada pengujian antimikroba (Karim, 2018)

2. Metode dilusi (pengenceran)

Metode ini menggunakan antimikroba dengan kadar yang menurun secara bertahap, baik dengan media cair atau padat. Kemudian media diinokulasikan ke dalam tabung uji dan diinkubasi. Tahap akhir antimikroba dilarutkan dengan kadar yang sangat rendah atau mematikan. Uji kepekaan cara dilusi-agar memakan banyak waktu dan penggunaannya terbatas pada keadaan tertentu saja.





Gambar 7. Metode Dilusi pada penentuan MIC aktivitas antimikroba (Karim, 2018)

Cara yang lebih sederhana dan banyak dipakai, yaitu dengan menggunakan *microdilution plate*. Keuntungan uji mikrodilusi cair adalah bahwa uji ini memberi hasil kuantitatif yang menunjukkan jumlah antimikroba yang dibutuhkan untuk membunuh mikroba.

