

**OPTIMASI PERTUMBUHAN ISOLAT *ACTINOMYCETES* (ISOLAT TE
235) DAN UJI AKTIVITAS TERHADAP BAKTERI *Escherichia coli* DAN
*Staphylococcus aureus***

SKRIPSI

**Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat dalam
Mencapai derajat Sarjana Farmasi (S.Farm.)
Program Studi Farmasi**



Oleh:

Sutiara Prihatining Tyas

NIM: 16.0605.0018

**FAKULTAS ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH MAGELANG
MAGELANG**

2020

OPTIMASI PERTUMBUHAN ISOLAT *ACTINOMYCETES* (ISOLAT TE
235) DAN UJI AKTIVITAS TERHADAP BAKTERI *Escherichia coli* DAN
Staphylococcus aureus

PERSETUJUAN PEMBIMBING

Skripsi yang diajukan oleh:

Sutiara Prihatining Tyas
NPM : 16.0605.0018

Telah Memenuhi Persyaratan Dan Disetujui Untuk Mengikuti
Seminar Hasil Skripsi
Universitas Muhammadiyah Magelang

Telah disetujui oleh :

Pembimbing Utama



(apt. Ni Made Ayu Nila S, M.Sc)
NIDN. 0613099001

Tanggal

18 Juni 2020

Pembimbing Pendamping



(apt. Alfian Syarifuddin, M.Farm)
NIDN. 0614099201

Tanggal

18 Juni 2020

PENGESAHAN SKRIPSI BERJUDUL

**OPTIMASI PERTUMBUHAN ISOLAT *ACTINOMYCETES* (ISOLAT TE
235) DAN UJI AKTIVITAS TERHADAP BAKTERI *Escherichia coli* DAN
*Staphylococcus aureus***

Oleh:

Sutiara Prihatining Tyas

NPM : 16.0605.0018

Dipertahankan di Hadapan Panitia Penguji Skripsi
Program Studi Farmasi (S1)
Universitas Muhammadiyah Magelang
Pada tanggal : 29 April 2020

Mengetahui
Fakultas Ilmu Kesehatan
Universitas Muhammadiyah Magelang
Dekan

(Puguh Widiyanto, S. Kp., M. Kep)

NIDN. 0621027203

Panitia Penguji

Tanda tangan

1. apt. Ratna Wijayatri, M.Sc

2. apt. Ni Made Ayu Nila S, M.Sc

3. apt. Alfian Syarifuddin, M.Farm


.....

.....

.....

HALAMAN PERSEMBAHAN

Dengan penuh rasa syukur karya sederhana ini saya persembahkan untuk Allah SWT, atas semua nikmat, kekuatan, kemudahan, dan anugerah yang telah engkau berikan kepada saya. Bapak dan ibu sebagai rasa hormat dan baktiku atas segala cinta dan penuh kasih sayang yang penuh ketulusan, terimakasih atas dukungan, nasehat, pengorbanan, dan doa yang diberikan sampai saat ini. Suami saya yang selalu mengajarku arti kesabaran dalam menghadapi segala ujian. Senior *Actinomyces* Bapak Alfian Syarifuddin M.Farm., Apt dan team penelitian *Actinomyces* UMMgl (Mbak Meysa, Sandi, dan Ican) terimakasih atas kerjasamanya dan ilmu yang sudah diberikan kepada saya. Sahabat-sahabatku seperjuangan dan sepenanggungan (Riska, Qory, Yunia, Ndaru, Iin, Zulda, Nur) yang telah membantu atau memberikan dukungan, serta almamaterku UMMgl.

Selain dukungan dan support dari orang terdekat, ada potongan ayat Al-qur'an dan motivasi yang selalu menguatkan penulisan dalam penyusunan naskah skripsi

“Allah tidak membebani seseorang melainkan sesuai dengan kesanggupannya”

(Q.S. Al-Baqarah : 286)

“Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan. Maka apabila kamu telah selesai dari satu urusan, kerjakanlah dengan sungguh-sungguh urusan yang lain”

(Q.S. Al-Insyirah :6-7)

“Janganlah kamu bersikap lemah, dan janganlah (pula) kamu bersedih hati, padahal kamulah orang yang paling tinggi (derajatnya), jika kamu orang yang beriman” **(Q.S Al Imron :139)**

“Sholat agar hatimu tenang, bezikir agar dadamu lapang, kunjungi orang tuamu agar mereka senang, insyaallah kebahagiaanmu akan segera datang”

(Tausiyahku)

“Rasa takut hanya akan membuatmu lemah dan kehilangan kepercayaan diri, hadapilah rasa takut itu dan truslah melangkah”

(Mario Teguh)

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam Skripsi ini tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang telah diterbitkan dalam kutipan dan disebutkan dalam daftar pustaka, dengan mengikuti ketentuan sebagaimana layaknya karya ilmiah.

Apabila di kemudian hari ditemukan indikasi plagiarisme dalam naskah ini, maka saya bersedia menanggung segala sanksi sesuai peraturan perundang-undangan yang berlaku.

Magelang, 29 April 2020

Sutiara Prihatining Tyas

NIM: 16.0605.0018

KATA PENGANTAR

Assalamualaikum, Wr. Wb.

Alhamdulillahirabbil'alamin Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan karunianya sehingga penulis dapat menyelesaikan Skripsi yang berjudul **“OPTIMASI PERTUMBUHAN ISOLAT *ACTINOMYCETES* (ISOLAT TE 235) DAN UJI AKTIVITAS TERHADAP BAKTERI *Escherichia coli* DAN *Staphylococcus aureus*”**

Karya ini merupakan tuntutan untuk memenuhi salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan Sarjana Farmasi pada S1 Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Magelang.

Terselesainya penyusunan skripsi ini tidak lepas dari arahan dan bimbingan dari Alfian Syarifuddin, M.Farm selaku pembimbing yang dengan penuh kesabaran dan ketulusan memberikan bimbingan, arahan, motivasi serta sumbangan pemikiran kepada penulis. Penulis mengucapkan banyak terima kasih yang setulus-tulusnya semoga Allah SWT membalasnya dengan pahala yang setimpal, Amin. Dalam penulisan Skripsi ini, penulis banyak menerima bimbingan dan bantuan dari berbagai pihak oleh karena itu pada kesempatan ini penulis menyampaikan ucapan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Puguh Widiyanto, S.Kp., M.Kep selaku Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Magelang.
2. Imron Wahyu Hidayat, M.Sc., Apt selaku Ketua Program Studi S-1 Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Magelang
3. Dosen pembimbing 1 Bapak Alfian Syarifuddin, M.Farm., Apt dan dosen pembimbing 2 Ibu Ni Made Ayu Nila S, M.Sc., Apt
4. Dosen penguji Ibu Ratna Wijayatri, M.Sc., Apt
5. Seluruh dosen jurusan farmasi Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Magelang
6. Seluruh staf laboran farmasi yang telah melayani penulis selama melakukan penelitian

7. Sahabat-sahabatku tercinta angkatan 2016 yang selalu setia memberi semangat penulis, terima kasih.

Penulis juga menyadari bahwa Skripsi ini masih banyak kekurangan, oleh karena itu penulis mengharapkan kritikan dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan penulisan ini. Akhirnya atas segala bantuan dan dorongan dari semua pihak yang membantu semoga mendapat karunia Allah SWT.

Aamiin Yaa Rabbal'alam

Wasalamu'alaikum wr wb.

Magelang, 29 April 2020

Sutiara Prihatining Tyas

NIM: 16.0605.0018

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
PERSETUJUAN PEMBIMBING.....	ii
PENGESAHAN SKRIPSI BERJUDUL.....	iii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iv
PERNYATAAN.....	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL.....	xiii
INTISARI.....	xiv
<i>ABSTRACT</i>	xv
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	2
C. Tujuan Penelitian	3
D. Manfaat Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
A. Kajian teori.....	5
B. Kerangka Teori.....	27
C. Kerangka konsep.....	28
BAB III METODE PENELITIAN.....	29
A. Bahan dan Alat.....	29
B. Prosedur Penelitian.....	29
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	60
A. KESIMPULAN	60
B. SARAN	60
DAFTAR PUSTAKA	61

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Kurva Pertumbuhan Bakteri.....	12
Gambar 2.2 Kerangka Teori.....	27
Gambar 2.3 Kerangka Konsep.....	28
Gambar 3.1 Desain Penelitian.....	34

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Kategori Potensi Antibiotika.....	7
---	---

INTISARI

Penyakit infeksi menjadi salah satu permasalahan dalam bidang kesehatan khususnya di negara berkembang. Faktor penyebab tingginya kasus infeksi adalah penyalahgunaan dalam pemakaian antibiotik sehingga terdapat multiresistensi antibiotik sehingga perlu dilakukan eksplorasi untuk mendapatkan antibiotik baru yang poten. *Actinomycetes* merupakan mikroorganisme yang dapat memproduksi metabolit sekunder. Isolat *Actinomycetes* (isolat TE 235) telah diisolasi dari tanah rizofor tanaman perakaran tebu. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui waktu optimal isolat TE 235 dalam produksi metabolit sekunder (antibiotik) yang berpotensi terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* serta profil pertumbuhan isolat TE 235 ditinjau berdasarkan produksi biomasa sel dan serapan spektrofotometri UV-VIS. Pengujian aktivitas antibakteri isolat *Actinomycetes* dengan metode difusi. Hasil penelitian menunjukkan cairan kultur isolat *Actinomycetes* (isolat TE 235) mempunyai waktu optimal produksi metabolit sekunder terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* setelah inkubasi selama 10 hari dengan diameter zona hambat sebesar $6,67 \pm 0,94$ mm, sedangkan terhadap bakteri *Escherichia coli* pada hari ke-7 dengan diameter zona hambat sebesar $10,00 \pm 0,82$ mm. Profil pertumbuhan bakteri *Actinomycetes* isolat TE 235 berdasarkan berat sel dan spektrofotometri UV-VIS terjadi pertumbuhan optimal pada hari ke-9. Kesimpulan pada penelitian ini menunjukkan bahwa *Actinomycetes* dapat diisolasi dari tanah perakaran tebu dan berpotensi sebagai penghasil antibiotik dengan menghambat bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

Kata Kunci : *Actinomycetes*, cairan kultur isolat TE 235, metabolit sekunder

ABSTRACT

Infectious disease is one of the problems in the health sector, especially in developing countries. Factors that cause high cases of infection are the misuse of antibiotics so that there is multi-resistance of antibiotics so exploration is needed to get potential new antibiotics. *Actinomycetes* are microorganisms that can produce secondary metabolites. *Actinomycetes* isolate (isolate TE 235) has been isolated from rizofer soil of sugarcane root crop. The purpose of this study was to determine the optimal time of TE 235 isolates in the production of secondary metabolites (antibiotics) that have the potential to *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* bacteria and the growth profile of the TE 235 isolates were reviewed based on cell biomass production and UV-VIS spectrophotometric absorption. Testing the antibacterial activity of *Actinomycetes* isolates by diffusion method. The results showed that the liquid culture of *Actinomycetes* isolate (isolate TE 235) had optimal time to produce secondary metabolites against *Staphylococcus aureus* bacteria after incubation for 10 days with inhibition zone diameter of 6.67 ± 0.94 mm, whereas against *Escherichia coli* bacteria on day-to-day 7 with inhibition zone diameter of 10.00 ± 0.82 mm. The growth profile of *Actinomycetes* isolate TE 235 based on cell weight and UV-VIS spectrophotometry occurred optimal growth on the 9th day. The conclusions in this study indicate that *Actinomycetes* can be isolated from sugarcane rooting soil and potentially produce antibiotics by inhibiting the bacteria *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*

Keywords: *Actinomycetes*, TE 235 isolate culture fluid, secondary metabolites

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Penyakit infeksi masih menjadi salah satu permasalahan dalam bidang kesehatan khususnya di negara berkembang. Salah satu bakteri yang dapat menyebabkan infeksi adalah bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* (S. Wulandari & Sulistyani, 2016). Bakteri *Escherichia coli* dapat mengakibatkan diare, dan bila bakteri ini menjalar ke sistem atau organ tubuh yang lain, maka dapat menyebabkan infeksi pada saluran kemih (Sutiknowati, 2016). Bakteri *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri yang dapat menyebabkan infeksi pada kulit manusia, contohnya jerawat, bisul dan penyakit luka (Aziz, 2017). Salah satu penyembuhan penyakit infeksi menggunakan antibiotik, karena antibiotik merupakan substansi yang di hasilkan oleh satu mikroorganisme dalam jumlah sangat kecil yang dapat menghambat pertumbuhan jasad renik lain dan merupakan senyawa kimia yang utama untuk pengobatan penyakit infeksi (Nugrahani, 2013).

Pengobatan penyakit infeksi menggunakan antibiotik masih terdapat kendala karena adanya faktor resistensi bakteri terhadap antibiotik. Salah satu penyebab terjadinya faktor resistensi bakteri terhadap antibiotik adalah karena terjadi penyalahgunaan antibiotik (Sulistyani & Akbar, 2014). Oleh sebab itu, sangat diperlukan eksplorasi baru untuk mendapatkan mikroorganisme yang menghasilkan antibiotik dengan potensi lebih tinggi dalam mematikan penyakit infeksi. Salah satu sumber potensial penghasil antibiotik adalah *Actinomycetes* (W. Wulandari & Rahayu, 2015). *Actinomycetes* merupakan bakteri pada tanah

perakaran tumbuhan (*rezofer*) yang dapat digunakan sebagai sumber penting antibiotik (Nurkanto & Agusta, 2015). Bakteri *Actinomycetes* dikenal sebagai bakteri penghasil antibiotik paling banyak sekitar 70% - 80%. Sebanyak 22.500 senyawa biologis aktif yang diperoleh dari mikroba, 45% dihasilkan oleh *Actinomycetes*, 38% oleh fungi, dan 17% oleh bakteri uniseluler (Ramadhan, 2019). Peran bakteri *Actinomycetes* pada industri farmasi menjadi sangat penting karena kemampuannya dalam memproduksi senyawa metabolit yang banyak dikembangkan sebagai bahan obat dan mempunyai aktivitas menghambat pertumbuhan bakteri (Nurkanto & Agusta, 2015).

Berdasarkan latar belakang diatas, peneliti akan melakukan penelitian mengenai optimasi pertumbuhan isolat *Actinomycetes* (isolat TE235) dan uji aktivitas terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*, sehingga di peroleh perkiraan waktu fermentasi antibiotik yang paling optimal, untuk mempermudah pengamatan profil optimasi waktu fermentasi yang optimal, diamati dengan membuat grafik hubungan antara biomasa sel dengan waktu, grafik hubungan antara absorbansi dengan waktu dan grafik hubungan antara zona hambat dengan waktu inkubasi.

B. Rumusan Masalah

1. Bagaimana profil pertumbuhan bakteri *Actinomycetes* isolat TE 235 berdasarkan berat sel yang dihasilkan?
2. Bagaimana profil pertumbuhan bakteri berdasarkan serapan pada Spektrofotometri UV-VIS?

3. Bagaimana aktivitas cairan kultur isolat *Actinomyces* TE 235 terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* ?

C. Tujuan Penelitian

1. Mengetahui profil pertumbuhan bakteri *Actinomyces* isolat TE 235 berdasarkan berat sel yang dihasilkan.
2. Mengetahui profil pertumbuhan bakteri berdasarkan serapan pada Spektrofotometri UV-VIS.
3. Mengetahui aktivitas cairan kultur isolat *Actinomyces* TE 235 terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

D. Manfaat Penelitian

1. Ilmu Pengetahuan dan Teknologi

Hasil penelitian Optimasi pertumbuhan isolat *Actinomyces* (isolat TE 235) dan uji aktivitas terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* diharapkan dapat digunakan sebagai referensi dalam bidang penelitian dan dapat dijadikan tambahan kepustakaan dalam pengembangan penelitian selanjutnya.

2. Institusi

Memberikan tambahan pengetahuan tentang Optimasi pertumbuhan isolat *Actinomyces* (isolat TE 235) dan uji aktivitas terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

3. Masyarakat

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah kepada masyarakat mengenai pemanfaatan tanah dari perakaran tebu (*rezofer*) yang dapat mendukung penemuan antibiotik baru sebagai alternatif untuk pengobatan penyakit infeksi.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Kajian teori

1. *Actinomycetes*

Actinomycetes merupakan mikroorganisme saprofitik termasuk kelompok bakteri gram positif yang dikenal sebagai bakteri pada tanah perakaran tumbuhan (*rizosfer*) yang memiliki sifat-sifat umum seperti bakteri dan dapat di gunakan sebagai sumber antibiotik (Nurkanto & Agusta, 2015). *Rizosfer* merupakan jenis tanah yang berada pada perakaran tanaman yang banyak mengandung bahan organik yang dapat memungkinkan *Actinomycetes* tumbuh secara optimal. Pertumbuhan *Actinomycetes* yang kurang optimal karena diperoleh dari lingkungan yang ekstrim, sebelumnya *Actinomycetes* tidak dikenal sebagai penghasil senyawa bioaktif, akan tetapi *Actinomycetes* sangat potensial sebagai penghasil senyawa bioaktif termasuk pada senyawa antibiotik (Wulandari & Sulistyani, 2016).

Actinomycetes termasuk mikroba heterotrof dan bersifat aerob. Keasamaan tanah (pH) yang sesuai untuk pertumbuhannya antara 6,5-8,0 dan populasinya akan menurun seiring dengan menurunnya derajat keasaman tanah. Kelembapan tanah yang sesuai untuk pertumbuhan *Actinomycetes* adalah 85%, bila kondisi tanah kering akan membentuk konidium. Suhu optimum untuk pertumbuhannya berkisar antara 25-30°C tetapi ada juga yang bersifat termofil dengan kisaran suhu optimum 55-65°C (Masda, 2018). Karakteristik umum *Actinomycetes* adalah :

- a. Jaringan hifa yang biasanya dikembangkan oleh *Actinomycetes*, tumbuh dengan baik dipermukaan substratum padat misalnya, agar, yang terdiri dari sejumlah besar nukleoid.
- b. *Actinomycetes* memiliki miselium yang membentang diatas substratum padat, dan menghasilkan spora berdinding tipis aseksual dan artifisial yang dikenal sebagai konidia.
- c. Spora yang ada dalam *Actinomycetes* tidak hanya bervariasi dalam hal bentuk dan ukuran, tetapi juga dengan bantuan pembentukan septum diujung filamen.
- d. Kebanyakan *Actinomycetes* tidak ditemukan motil dan motilitasnya hanya terbatas pada spora flagella (Hikmawati, 2018).

2. Antibiotik

Antibiotik merupakan mikroorganisme yang dapat menghambat mikroorganisme berbahaya di dalam tubuh seperti penyakit infeksi (Nugrahani, 2013).

- a. Berdasarkan kegiatannya antibiotik dibagi menjadi dua golongan, yaitu antibiotik spektrum luas, antibiotik spektrum sempit.

- 1) Antibiotik spektrum luas

Merupakan antibiotik yang dapat mematikan Gram positif dan bakteri Gram negatif. Antibiotik jenis ini dapat mematikan sebagian besar bakteri, termasuk virus dan protozoa. Contohnya Tetrasiklin dan derivatnya, kloramfenikol serta Ampisillin.

2) Antibiotik spektrum sempit

Merupakan golongan antibiotik yang hanya aktif terhadap beberapa jenis bakteri. Contohnya penicillin, streptomisin, neomisin, basitrasina (Wasitaningrum, 2009). Potensi penghambatan antibiotik terhadap pertumbuhan mikroorganisme, disajikan dalam Tabel 2.1

Tabel 2.1 Kategori Potensi Antibiotika

No	Zona Hambat	Potensi
1	> 20 mm	Sangat Kuat
2	10-20 mm	Kuat
3	5-10 mm	Sedang
4	0-5 mm	Lemah

(Indrawati & Rizki, 2017)

b. Mekanisme kerjanya antibiotik dibagi menjadi lima kelompok yaitu:

1) Antibiotik yang menghambat sintesis dinding sel

Merupakan antibiotik yang bekerja untuk merusak penyusun dinding sel bakteri gram positif maupun negatif, yakni lapisan peptidoglikan.

2) Antibiotik yang merusak membran plasma

Merupakan antibiotik yang mengubah permeabilitas membran plasma sel bakteri.

3) Antibiotik yang menghambat sintesis protein

Merupakan antibiotik yang menghambat sintesis protein pada bakteri dengan spektrum yang luas.

4) Antibiotik yang menghambat asam nukleat (DNA/RNA)

Merupakan antibakteri yang menghambat proses transkrip dan replikasi DNA ataupun RNA.

5) Antibiotik yang menghambat sintesis metabolit

Merupakan antibiotik yang menghambat metabolit mikroorganismenya
(Jawa, 2016).

3. Bakteri

Bakteri adalah mikroba prokariotik uniseluler dan berkembang biak dengan cara aseksual dengan pembelahan sel. Bakteri tidak berklorofil namun ada yang bersifat fotosintetik, kemudian bakteri hidup secara bebas, parasit, saprofit, sebagai patogen pada manusia, hewan dan tumbuhan. Habitat bakteri terdapat di alam, tanah, laut, atmosfer dan di dalam lumpur. Selain itu bakteri merupakan struktur sel yang tidak mempunyai membran inti sedangkan komponen genetiknya terdapat di dalam molekul DNA tunggal yang terdapat di dalam sitoplasma. Bakteri memiliki bentuk dan ukuran yang sangat beragam. Bakteri memiliki diameter 0,2-2 μm dan panjang 2-8 μm . Secara umum, sel bakteri terdiri atas beberapa bentuk, yaitu basil atau batang, bulat, dan spiral. Dinding sel bakteri mengandung kompleks karbohidrat dan protein yang disebut peptidoglikan. Ukuran sel-sel bakteri sangat bervariasi tergantung masing-masing jenisnya, namun pada umumnya 0,5-1,0 x 2,0-5 μm . Hal tersebut sama halnya dengan 10.000 bakteri yang panjang selnya 1 μm dari satu ujung ke ujung lainnya (Febrianasari, 2018).

a. Klasifikasi bakteri

Bentuk bakteri, kemampuan membentuk spora, cara memproduksi energi (anaerobik dan aerobik), dan reaksi terhadap pewarnaan Gram (Gram positif/negatif). Pewarnaan Gram dilakukan dengan cara sel diberi warna

ungu yang disebut violet Kristal, kemudian preparat diberi alkohol atau aseton yang berfungsi untuk mencuci violet kristal dari sel-sel Gram negatif, Bakteri yang tidak berubah warnanya karena alkohol disebut Gram positif (Padoli, 2016).

1) Bakteri gram negatif

Merupakan bakteri yang tidak mempertahankan zat warna kristal violet, proses pewarnaan Gram sehingga akan berwarna merah bila diamati dengan mikroskop. Bakteri gram negatif mempunyai membrane plasma tunggal yang dikelilingi dinding sel tipis berukuran 10-15nm, berlapis tiga (multi), kandungan lipid tinggi 11-22%, peptidoglikan ada di dalam lapisan kaku sebelah di dalam, jumlahnya sedikit, merupakan sekitar 10% berat kering, tidak ada asam tekoat, persyaratan nutrisi relatif sederhana, resisten terhadap gangguan fisik kurang resisten Contohnya yaitu bakteri *Eschericia coli*, dan *Pseudomonas* (Nydia, 2016).

2) Bakteri gram positif

Merupakan bakteri yang hanya mempunyai membran plasma tunggal yang dikelilingi dinding sel tebal berukuran 15-80 nm, berlapis tunggal (mono), kandungan lipid rendah 1-4%, berupa peptidoglikan digunakan sebagai lapisan tunggal yang memiliki komponen utama lebih dari 50% berat kering pada beberapa sel bakteri, ada asam tekoat, persyaratan nutrisi relatif rumit pada banyak spesies, resisten terhadap gangguan fisiknya lebih resisten, dan bakteri tersebut memiliki warna ungu.

Contohnya yaitu bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Bacillus subtilis* (Nydia, 2016).

b. Struktur eksternal bakteri meliputi glikokaliks, flagela, filamen aksial, fimbria, dan pili (Padoli, 2016)

- 1) Glikokaliks (selubung gula) adalah substansi yang mengelilingi sel atau digambarkan sebagai kapsul.
- 2) Flagela merupakan filamen yang mencuat dari sel bakteri dan berfungsi untuk pergerakan bakteri
- 3) Filamen aksial (*endoflagela*) adalah kumpulan benang yang muncul pada ujung sel di bawah selaput luar sel dan berpilin membentuk spiral di sekeliling sel.
- 4) Pili (tunggal pilus) secara morfologis sama dengan fimbria, umumnya pili lebih panjang. Pili berperan dalam transfer molekul genetik (DNA) dari satu bakteri ke bakteri lainnya pada peristiwa konjugasi secara khusus. Karena fungsinya yang spesifik pada transfer DNA bakteri, maka pili disebut sebagai pili seks.
- 5) Dinding sel bakteri adalah bagian struktur kompleks dan mempunyai fungsi sebagai penentu bentuk sel, pelindung sel dari kemungkinan rusak ketika tekanan air di dalam sel lebih besar, serta pelindung isi sel dari perubahan lingkungan di luar sel.

c. Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi pertumbuhan bakteri yaitu suhu, Ph, faktor kimia, oksigen (Febrianasari, 2018).

d. Macam - macam fase ^{pertumbuhan} mikroorganisme, yaitu fase *lag*, fase *log*, fase *stasioner* dan fase kematian (Padoli, 2016).

1) Fase *lag*

Merupakan fase adaptasi yaitu fase penyesuaian mikroorganisme pada suatu lingkungan baru. Ciri fase *lag* yaitu jumlah selnya tidak meningkat, hanya peningkatan ukuran sel. Terjadinya lama fase *lag* bergantung pada kondisi, jumlah awal mikroorganisme dan media pertumbuhan.

2) Fase *log*

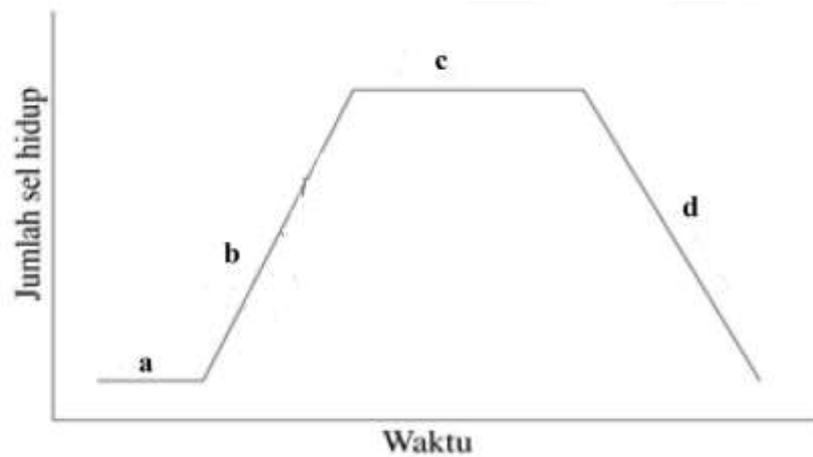
Merupakan fase di mana mikroorganisme tumbuh dan membelah pada kecepatan maksimum, tergantung pada genetika mikroorganisme, sifat media, dan kondisi pertumbuhan. Sel baru terbentuk dengan laju konstan dan masa yang bertambah secara eksponensial, oleh karena itu fase *log* disebut juga fase eksponensial.

3) Fase *stasioner*

Merupakan pertumbuhan mikroorganisme berhenti dan terjadi keseimbangan antara sel yang membelah dengan jumlah sel yang mati. Fase *stasioner* terjadi akumulasi produk buangan yang toksik. Pada sebagian besar kasus pergantian sel terjadi pada fase *stasioner*.

4) Fase kematian

Merupakan keadaan dimana jumlah sel yang mati meningkat, dan faktor penyebabnya adalah ketidaktersediaan nutrisi dan akumulasi produk buangan yang toksik.



Gambar 2.1 Kurva Pertumbuhan Bakteri

Keterangan :

- a.** fase *lag*
- b.** fase *eksponensial (log)*
- c.** fase *stasioner*
- d.** fase *kematian (Padoli, 2016)*

4. *Escherichia Coli*

a. Klasifikasi

Domain	: <i>Bacteria</i>
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>Escherichia coli</i> (Sutiknowati, 2016).

b. Morfologi

Escherichia coli merupakan bakteri gram negatif berbentuk batang dengan panjang sekitar 2 mikrometer dan diameter 0.5 mikrometer. Volume sel *Escherichia coli* berkisar $0.6-0.7 \text{ m}^3$ (Sutiknowati, 2016).

c. Sifat-sifat biakan

Bersifat aerob atau fakultatif anaerob dan tumbuh pada perbenihan biasa. Bakteri ini dapat tumbuh dengan mudah pada *medium nutrient* sederhana dengan rentang suhu $20-40^{\circ}\text{C}$ pada suhu optimumnya 37°C . Bakteri *Escherichia coli* adalah flora normal saluran usus manusia dan hewan, oleh karena itu *Escherichia coli* merupakan bakteri patogen penyebab infeksi paling sering pada manusia yang dianggap sebagai indikator organisme adanya kontaminasi pada makanan dan minuman (Sutiknowati, 2016).

Infeksi *ekstraintestinal* termasuk infeksi saluran kemih, yang terjadi ketika saluran terhambat atau secara spontan disebabkan oleh *Uropathogenic Escherichia coli* (UPEC), karena UPEC merupakan bakteri patogen pertama yang dapat menginfeksi saluran kemih. Infeksi yang lainnya adalah kolesistitis, usus buntu, peritonitis, infeksi luka pasca operasi, dan sepsis. Infeksi saluran kemih akut bakteri *Escherichia coli* merupakan organisme penyebab 70–80 % pada kasus kronik, 40–50 % penyebab infeksi persisten (Sutiknowati, 2016) .

d. Daya tahan

Bakteri ini dapat tahan berbulan-bulan pada tanah dan dalam air.

Kuman ini juga peka terhadap tetrasiklin (Sutiknowati, 2016).

5. *Staphylococcus aureus*

a. Klasifikasi

Domain : *Bacteria*

Kingdom : *Eubacteria*

Filum : *Firmicutes*

Ordo : *Bacillales*

Kelas : *Bacilli*

Famili : *Staphylococcaceae*

Genus : *Staphylococcus*

Spesies : *S. aureus*

Nama binomial : *Staphylococcus aureus* (Aziz, 2017)

b. Morfologi

Sel berbentuk bulat atau kokus, membentuk kelompok-kelompok tidak teratur seperti susunan buah anggur. Pembentukan dalam kelompok ini terjadi karena pembelahan sel terjadi dalam tiga bidang dan sel-sel anaknya cenderung untuk tetap berada didekat sel induknya. Koloni berwarna abu-abu hingga kuning tua, koagulase positif dan sifatnya sebagai bakteri komensal dalam tubuh manusia yang jumlahnya berimbang dengan flora normal lain (Dewi, 2013).

c. Sifat-sifat biakan

Staphylococcus aureus merupakan bakteri gram positif anggota famili *Micrococcaceae* yang dapat dikultur pada media nutrien normal baik secara aerob maupun anaerob. Bakteri *Staphylococcus aureus* berdiameter 0,7 – 1,2 μm , tumbuh cepat pada suhu 37°C tetapi membentuk pigmen paling baik pada suhu kamar 20-25°C. Infeksi organ manusia pada bakteri *Staphylococcus aureus* dapat di temukan pada hidung, kulit, tenggorokan, selaput lendir, bisul dan luka. Beberapa penyakit infeksi yang di sebabkan oleh bakteri *Staphylococcus aureus* adalah bisul, jerawat dan infeksi luka. Infeksi yang lebih berat diantaranya pneumonia, mastitis, plebitis, meningitis, infeksi saluran kemih, *osteomyelitis*, dan *endocarditis* (Aziz, 2017).

d. Daya tahan

Merupakan salah satu kuman yang cukup kebal diantara organisme-organisme tak berspora . Tahan dipanaskan pada 60°C selama 30 menit . Tahan terhadap 1% fenol selama 15 menit (Aziz, 2017).

6. Metabolit

Metabolit adalah hasil dari metabolisme. Metabolit di bagi menjadi dua macam, yaitu metabolit primer dan metabolit sekunder.

a. Metabolit primer

1) Pengertian Metabolit Primer

Merupakan senyawa atau molekul yang merupakan produk akhir atau produk antara dalam proses metabolisme makhluk hidup, yang

fungsinya sangat esensial dan penting bagi kelangsungan hidup organisme tersebut, serta terbentuk secara intraseluler. Metabolit primer dibentuk dalam jumlah terbatas karena penting untuk pertumbuhan dan kehidupan makhluk hidup. Contohnya adalah protein, lemak, karbohidrat dan DNA.

2) Ciri-ciri metabolit primer

- a) Terbentuk melalui metabolisme primer
- b) Memiliki fungsi yang esensial dan jelas bagi kelangsungan hidup organisme penghasilnya merupakan komponen esensial tubuh, misalnya asam amino, vitamin, nukleotida, asam nukleat, lemak.
- c) Sering berhubungan dengan pertumbuhan organisme penghasilnya.
- d) Bersifat tidak spesifik karena ada pada semua makhluk hidup.
- e) Buat dan simpan secara intraseluler.
- f) Buat dalam kuantitas yang cukup banyak.
- g) Hasil akhir dari metabolisme energy adalah etanol (Hikmawati, 2018).

b. Metabolit sekunder

1) Pengertian Metabolit Sekunder

Merupakan metabolit yang dihasilkan oleh proses metabolisme sekunder, dimana hasil metabolit tersebut bukan merupakan kebutuhan pokok mikroorganisme untuk hidup tumbuh. Metabolit sekunder pada kondisi stres tidak digunakan untuk pertumbuhan dan dibentuk dari metabolit primer. Contohnya adalah antibiotik, pigmen, toksin, efektor kompetisi ekologi dan simbiosis, feromon, inhibitor enzim, agen

immunomodulasi, reseptor antagonis dan agonis, pestisida, agen antitumor, dan promotor pertumbuhan binatang dan tumbuhan (Hikmawati, 2018).

2) Karakteristik metabolit sekunder

Merupakan metabolit yang tidak diproduksi pada saat pertumbuhan sel secara cepat (fase logaritmik), tetapi biasanya dapat disintesis pada akhir siklus pertumbuhan sel (fase stasioner) saat populasi sel setabil karena jumlah sel yang tumbuh sama dengan jumlah sel yang mati. Pertumbuhan pada fase stasioner sel mikroorganisme lebih tahan terhadap keadaan lingkungan yang tidak memungkinkan organisme lain untuk hidup misalnya suhu yang lebih panas atau dingin, radiasi, bahan-bahan kimia dan metabolit yang dihasilkannya sendiri (Masda, 2018).

3) Pembentukan metabolit sekunder diatur oleh nutrisi, penurunan kecepatan pertumbuhan, *feedback control*, inaktivasi enzim, dan induksi enzim (Hikmawati, 2018).

4) Ciri-ciri metabolit sekunder

- a) Terbentuk melalui proses metabolisme sekunder
- b) Produksi selama fase stasioner
- c) Fungsi bagi organisme penghasil belum jelas, diduga tidak berhubungan dengan sistem komponen sel atau pertumbuhan
- d) Membuat dan menyimpan secara ekstraseluler
- e) Hanya dibuat oleh spesies tertentu dan dalam jumlah terbatas

- f) Umumnya di produksi oleh fungi filamentus dan bakteri pembentuk spora
- g) Merupakan kekhasan bagi spesies tertentu
- h) Biasanya berhubungan dengan aktivitas antimikroba, enzim spesifik, penghambatan, pendorongan pertumbuhan dan sifat-sifat farmakologis (Hikmawati, 2018).

7. Aktivitas Antibakteri

a. Metode difusi

Metode yang sering di gunakan adalah metode difusi agar dengan menggunakan kertas cakram. Prinsip metode difusi adalah mengukur zona hambat pertumbuhan bakteri yang terjadi akibat difusi zat yang bersifat sebagai antibakteri di dalam media pada melalui pencadang. Daerah hambatan pertumbuhan bakteri terjadi pada daerah bening di sekitar cakram. Luas daerah berbanding lurus dengan aktivitas antibakteri, semakin kuat daya aktivitas antibakteri maka semakin luas daerah hambatannya.

1) Metode *disc diffusion* (*tes Kirby & Bauer*)

Metode *disc diffusion* (*tes Kirby & Bauer*) bertujuan untuk menentukan aktivitas agen antimikroba. Kertas cakram yang berisi agen antimikroba diletakkan pada media agar yang telah di gores dengan mikroorganisme yang akan berdifusi pada media agar. Pengamatan di lakukan pada area jernih mengindikasikan adanya hambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh agen antimikroba pada permukaan media agar (Arini Eka Pratiwi, 2015).

2) *Tes Epsilometer (E-test)*

Metode *E-test* bertujuan untuk mengestimasi KHM (Kadar Hambat Minimum), yaitu konsentrasi minimal agen antimikroba dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Metode *E-test* menggunakan strip plastik yang mengandung agen antimikroba dari kadar rendah sampai tinggi yang diletakkan pada permukaan media agar yang telah ditanami mikroorganisme. Pengamatan dilakukan pada area jernih yang menunjukkan kadar agen antimikroba dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme pada media agar (Arini Eka Pratiwi, 2015).

3) *Ditch-plate technique*

Metode *Ditch-plate technique* dilakukan dengan cara sampel uji berupa agen antimikroba diletakkan pada parit yang dibuat dengan cara memotong media agar dalam cawan petri pada bagian tengah secara membujur dan mikroba uji digoreskan ke arah parit yang berisi agen antimikroba (Arini Eka Pratiwi, 2015).

4) Metode Sumuran (*Cup-plate technique*)

Metode *Cup-plate technique* dilakukan dengan cara buat sumuran pada media agar yang telah ditanami dengan mikroorganisme dan pada sumur tersebut diberi agen antimikroba yang akan diuji (Arini Eka Pratiwi, 2015).

b. Metode dilusi

Metode dilusi dibedakan menjadi dua, yaitu dilusi cair (*broth dilution*) dan dilusi padat (*solid dilution*). Metode dilusi bertujuan untuk

menentukan konsentrasi terkecil suatu zat antibakteri dapat menghambat pertumbuhan atau membunuh bakteri uji. Metode dilusi menggunakan waktu yang lama dalam pengerjaannya sehingga jarang di gunakan.

1) Metode dilusi cair

Metode ini dengan mengukur KHM (Kadar Hambat Minimum) dan KBM (Kadar Bunuh Minimum). Dengan cara membuat seri pengenceran agen antimikroba pada medium cair yang ditambahkan dengan mikroba uji. Larutan uji agen antimikroba pada kadar terkecil yang terlihat jernih tanpa adanya pertumbuhan mikroba uji dapat ditetapkan sebagai KHM. Larutan yang ditetapkan sebagai KHM selanjutnya dikultur ulang pada media cair tanpa penambahan mikroba uji ataupun agen antimikroba, kemudian diinkubasi selama 18-24 jam. Media cair yang tetap terlihat jernih setelah inkubasi ditetapkan sebagai KBM (Arini Eka Pratiwi, 2015).

2) Metode dilusi padat

Metode dilusi padat sama dengan metode dilusi cair namun menggunakan media padat (solid). Keuntungan metode ini merupakan satu konsentrasi agen antimikroba yang diuji dapat digunakan untuk menguji beberapa mikroba uji (Arini Eka Pratiwi, 2015)

8. Instrumen Penelitian

a. Spektrofotometri

Spektrofotometri merupakan salah satu metode dalam kimia analisis yang digunakan untuk menentukan komposisi suatu sampel baik secara

kuantitatif dan kualitatif yang didasarkan pada interaksi antara materi dengan cahaya. Cahaya yang dimaksud dapat berupa cahaya visibel, UV dan infra merah (Suharti, 2017).

1) Jenis-jenis spektrofotometer dibagi menjadi dua yaitu spektrofotometer *single beam* dan spektrofotometer *double-beam*.

a) Spektrofotometer *single-beam*

Merupakan cahaya hanya melewati satu arah sehingga nilai yang diperoleh hanya nilai absorbansi dari larutan yang dimasukan.

b) Spektrofotometer *double-beam*

Merupakan cahaya melewati dua arah sehingga nilai blanko dapat langsung diukur bersamaan dengan larutan yang diinginkan dalam satu kali proses yang sama (Suharti, 2017).

2) Berdasar sumber cahaya yang digunakan, spektrofotometri terdiri dari beberapa jenis, diantaranya adalah

a) Spektrofotometri Visible (Spektro Vis)

Merupakan salah satu jenis spektrofotometer yang menggunakan sumber cahaya atau energi yang tampak (terlihat). Jenis cahaya visibel termasuk spektrum elektromagnetik yang bisa ditangkap oleh mata manusia. Kisaran panjang gelombang pada sinar visibel berada antara 380 – 750nm.

b) Spektrofotometri UV (ultraviolet)

Menggunakan sumber cahaya Ultra Violet dengan kisaran panjang gelombang antara 190 – 380nm. Lampu yang digunakan pada

spektrofotometer jenis ini adalah *deuterium lamp*. Sifat sinar Ultra Violet tidak bisa terdeteksi oleh mata manusia. Senyawa yang dapat menyerap sinar ini pada umumnya tidak boleh bening atau transparan, oleh karena itu, sampel tidak berwarna tidak perlu dibuat berwarna dengan penambahan *reagent* tertentu.

c) Spektrofotometri UV-Vis

Merupakan gabungan antara spektrofotometri UV dan Visibel. Sinar Spektrofotometri UV-VIS merupakan alat untuk mengukur transmittan atau absorban suatu sampel sebagai fungsi panjang gelombang. Absorpsi oleh molekul pada panjang gelombang 200-800 nanometer. Sinar ultraviolet mempunyai panjang gelombang antara 200-400 nm, sementara sinar tampak mempunyai panjang gelombang 400-800 nm (Suharti, 2017). Cahaya UV tidak bisa dilihat oleh manusia, namun beberapa hewan, termasuk burung, reptil dan serangga seperti lebah dapat melihat sinar pada panjang gelombang UV (Suharti, 2017).

Spektrofotometri UV-VIS digunakan untuk mengukur kekeruhan dikarenakan untuk mengetahui perbandingan antara hasil uji pada spektrofotometri UV-VIS dengan hasil pada biomasa sel, karena bakteri yang bermultiplikasi pada media cair akan menyebabkan media menjadi keruh, sehingga dapat dilakukan dengan cara membandingkan pengukuran OD (*optical density*) antara media tanpa pertumbuhan bakteri dan media dengan pertumbuhan bakteri. Pengukuran OD tersebut bertujuan untuk mengetahui pola pertumbuhan bakteri,

dikarenakan banyaknya jumlah sel di dalam media cair berbanding lurus dengan besarnya absorbansi (Salim, Senandi, & Fitria, 2016).

Hasil kurva pertumbuhan pada spektrofotometri UV-VIS jika semakin kecil kekeruhan absorbansi semakin turun, semakin besar kekeruhan absorbansi semakin naik sebaliknya dengan hasil kurva pertumbuhan pada biomasa sel semakin kecil kekeruhan biomasa sel semakin sedikit, semakin besar kekeruhan biomasa sel semakin banyak. Contoh : hasil penelitian yang dilakukan oleh (Salim et al., 2016) pada isolat 16IM7 pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm menjelaskan bahwa isolat 16IM7 berada dalam fase log mulai hari ke-2 waktu inkubasi hingga hari ke-11 dan fase stasioner dimulai hari ke 14. Waktu ekstraksi metabolit sekunder dilakukan pada fase stasioner.

b. Prinsip kerja Spektrofotometri UV-VIS

Mengacu pada hukum *Lambert-Beer*. Apabila cahaya monokromatik melalui suatu media (larutan), maka sebagian cahaya tersebut akan diserap, sebagian dipantulkan dan sebagian lagi akan dipancarkan (Suharti, 2017).

a) Syarat Pengukuran :

- 1) Harus melarutkan sampel dengan sempurna.
- 2) Pelarut yang dipakai tidak mengandung ikatan rangkap terkonjugasi pada struktur molekulnya dan tidak berwarna (tidak boleh mengabsorpsi sinar yang dipakai oleh sampel).
- 3) Tidak terjadi interaksi dengan molekul senyawa yang dianalisis
- 4) Kemurniannya harus tinggi (Suharti, 2017).

b) Kelebihan Spektrofotometri UV-VIS

- 1) Panjang gelombang dari sinar putih dapat lebih terseleksi.
- 2) Dapat menganalisa larutan dengan konsentrasi yang sangat kecil (Suharti, 2017).

c) Kekurangan Spektrofotometri UV-Vis

- 1) Absorpsi dipengaruhi oleh pH larutan, suhu dan adanya zat pengganggu kebersihan dari kuvet.
- 2) Hanya dapat dipakai pada daerah ultra violet yang panjang gelombang >185 nm.
- 3) Pemakaian hanya pada gugus fungsional yang mengandung elektronvalensi dengan energi eksitasi rendah.
- 4) Sinar yang dipakai harus monokromatis.
- 5) Proses Absorpsi Cahaya pada Spektrofotometri.
- 6) Tidak bisa mendeteksi fase kematian (Suharti, 2017).

d) Bagian-bagian dan fungsi Spektrofotometri UV-VIS

1) Sumber cahaya

Sumber-sumberlampu: lampu deuterium digunakan untuk daerah UV pada panjang gelombang 190-350 nm, sementara lampu halogen kuarsa atau lampu tungsten digunakan untuk daerah visible (350-900 nm).

2) Monokromator

Monokromator digunakan untuk mendispersikan sinar ke dalam komponen- komponen panjang gelombangnya yang selanjutnya akan dipilih celah (*slit*).

3) Sampel Kompartemen

Sel atau kuvet adalah wadah berbentuk kotak empat persegi panjang atau silinder untuk menyimpan larutan yang diukur. Kuvet kaca digunakan untuk pengukuran di daerah sinar tampak (380 – 1100 nm) karena bahan dari kaca mengabsorpsi radiasi UV. Kuvet silika dapat digunakan untuk pengukuran di daerah ultra violet dan sinar tampak (190 – 1100 nm). Kuvet yang digunakan mempunyai ketebalan tertentu yaitu 1, 2, 5, dan 10 cm. Ukuran kuvet yang biasa digunakan adalah kuvet berukuran 1 cm dengan kapasitas 4 ml.

4) Detektor

Mengukur radiasi yang ditransmisikan oleh sampel dan mengukur intensitas radiasi. Radiasi diubah menjadi energi listrik oleh sel tabung foto, *fotovoltaik* atau silikon fotodida.

5) Rekorder

Suatu sistem baca yang menangkap besarnya syarat listrik yang berasal dari detektor (Suharti, 2017).

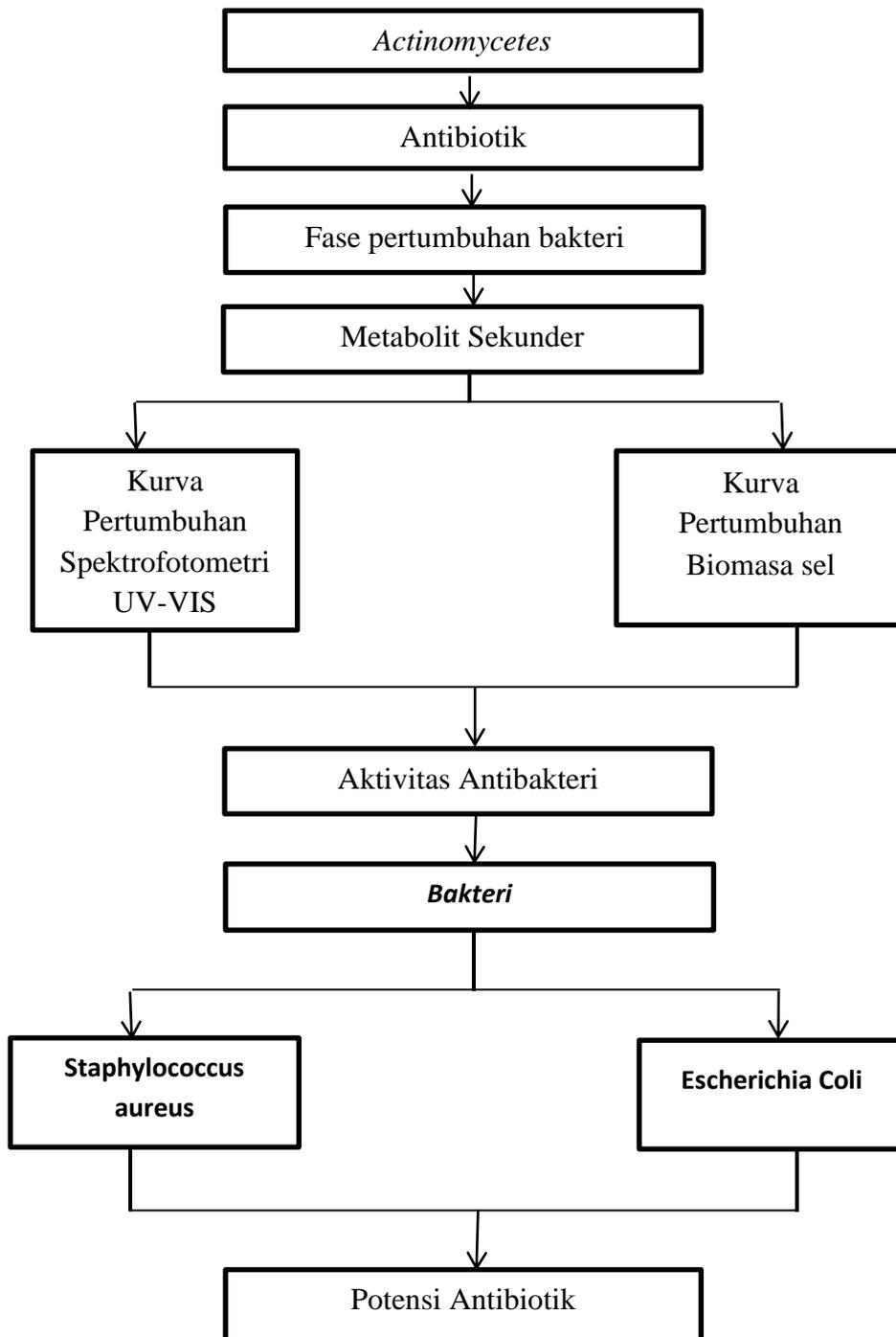
e) Spektrofotometri IR (Infra Red)

Spektrofotometri *Infra Red* (Infra Merah) merupakan suatu metode dalam mengamati interaksi molekul dengan radiasi elektromagnetik yang berada pada panjang gelombang 2.5-1000 μm . spektrum IR digunakan untuk mengidentifikasi gugus fungsi pada suatu senyawa, terutama senyawa organik. Setiap serapan pada panjang gelombang tertentu menggambarkan adanya suatu gugus fungsi spesifik (Suharti, 2017).

f) Spektrofotometri Serapan Atom (AAS)

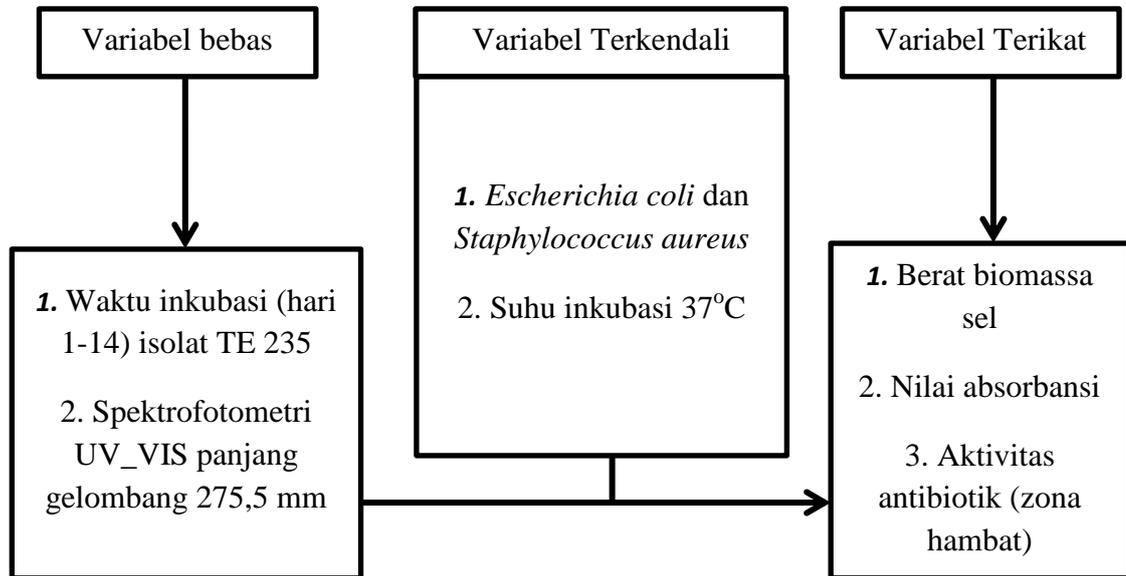
Spektrofotometri serapan atom (AAS) adalah suatu metode analisis yang didasarkan pada proses penyerapan energi radiasi oleh atom-atom yang berada pada tingkat energi dasar (*ground state*). Spektrofotometer Serapan atom (AAS) digunakan untuk penentuan unsur-unsur logam dan metaloid yang berdasarkan pada penyerapan (absorpsi) radiasi oleh atom-atom bebas unsur tersebut (Suharti, 2017).

B. Kerangka Teori



Gambar 2.2 Kerangka Teori

C. Kerangka konsep



Gambar 2.3 Kerangka Konsep

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Bahan dan Alat

1. Bahan

Bahan utama yang di gunakan dalam penelitian ini adalah *stater* isolat TE 235 dari *rezosfer* tanaman tebu (*Saccharum officinarum L*). Bahan untuk pembuatan media SNB (*Starch Nitrat Broth*) yaitu *soluble starch*, NaCl, KNO₃, K₂HPO₄·3H₂O, MgSO₄·7H₂O, FeSO₄·7H₂O. Bahan yang digunakan untuk uji adalah cairan kultur isolat TE235, media BHI, media *Mueller Hinton*. Mikroorganisme yang diuji adalah *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

2. Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain, cawan petri, pipet volume, erlenmeyer, tabung reaksi, kapas lidi steril, *magnet stirer*, vortex, *autoclaf*, *yellow tip*, timbangan analitik, pinset, lampu spirtus, kertas koran, *LAF*, kulkas, inkubator dan *eppendorf*, *sentrifuse*.

B. Prosedur Penelitian

1. Sterilisasi

Alat-alat gelas yang digunakan dicuci kemudian dikeringkan dan dibungkus menggunakan aluminium foil, kemudian dimasukkan ke dalam oven dan dipanaskan pada suhu 171°C selama kurang lebih 2 jam. Sterilkan erlenmeyer yang berisi media SNB, *yellow tip* dan *eppendorf* yang dimasukan

kedalam toples kaca yang atasnya di tutup menggunakan aluminium foil disterilkan dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit (M. aprilliana Ramadhani & Sulistyan, 2018).

2. Pembuatan kultur *stater*.

Actinomyces Isolat Te 235 di ambil sebanyak 5mL lalu diinokulasi kedalam erlenmeyer yang berisi 50 ml media cair *starch nitrat broth* (SNB), kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 5 hari dengan pengadukan menggunakan *magnetic stirrer* (Warsi & Sulistyani, 2018).

3. Kultur Uji

a. Preparasi kultur uji

Preparasi kultur uji dilakukan dengan cara memasukkan 50 mL starter ke dalam Erlenmeyer yang berisi 500 mL media SNB yang sudah disterilkan. Media tersebut diinkubasi pada suhu kamar selama 14 hari dengan pengadukan menggunakan *magnetic stirrer*. Selama inkubasi tersebut, setiap hari kultur diambil sebanyak 1 mL dan dimasukkan kedalam eppendorf lalu diberi label dan disimpan didalam *freezer*. Preparasi kultur uji ini dilakukan diruangan *LAF* untuk meminimalkan terjadinya kontaminasi (Syarifuddin et al., 2019).

b. Penyiapan supernatan

Penyimpanan supernatan di lakukan dengan cara kultur uji yang telah diambil selama 14 hari dikeluarkan dari *freezer* dan dibiarkan hingga mencair. Kultur tersebut disentrifuse dengan kecepatan 8000 rpm selama 10 menit untuk memisahkan antara supernatan dan endapan. Supernatan yang

diperoleh dimasukkan ke dalam *ependorf* baru. Supernatan ini disebut sebagai cairan kultur uji (Nanjwade, 2010). Berat biomasa sel digunakan untuk optimasi fase pertumbuhan isolate Te 235.

4. Penyiapan Bakteri

Pembuatan stok bakteri dilakukan dengan cara mengambil 1 ose bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* masukkan kedalam 1 mL BHI kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Sebanyak 100 µL, suspensi bakteri dimasukkan dalam tabung, ditambahkan 1 mL BHI, dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 3-5 jam. Suspensi sebanyak 1 ml diencerkan dengan NaCl 0,9% sampai kekeruhan sama dengan standar Mc Farland 10⁸ CFU/mL (Radji, 2011).

5. Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri isolat TE 235 *Actinomycetes* menggunakan media agar *Mueller Hinton*. Uji ini menggunakan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Setiap mikroorganisme yang akan diuji sebelumnya telah dibuat suspensi bakteri. Cawan petri yang berisi media *Mueller Hinton* diolesi suspensi bakteri uji secara zig-zag menggunakan lidi kapas steril, lalu tunggu sampai meresap kurang lebih 30 menit. Buat sumuran dengan menggunakan alat *cork borer* dengan diameter lingkarnya 6 mm. Setelah itu, setiap sumuran diisi dengan cairan kultur kurang lebih 20 µL sesuai dengan urutan harinya (hari ke 1-14) Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam, lalu diamati diameter zona hambatnya berupa zona bening di sekitar lubang sumuran yang menunjukkan aktivitas hambat dari cairan

kultur isolat *Actinomycetes* (isolat TE 235). Setelah itu menghitung diameter zona hambat (Pratiwi, 2015).

6. Analisis *Actinomycetes* dengan Spektrofotometri UV-VIS

Analisis kultur *Actinomycetes* isolate TE 235 menggunakan spektrofotometri UV-VIS pada panjang gelombang 275,5 nm dilakukan dalam jangka waktu 14 hari dan direplikasi sebanyak 3 kali (Salim et al., 2016).

7. Pemanenan dan Ekstraksi *Actinomycetes* Isolat TE 235

Kultur uji yang sudah diinkubasi selama 14 hari disaring menggunakan corong *Buchner* dan di dapatkan hasil pemanenan. Hasil pemanenan diekstraksi menggunakan etil asetat dengan perbandingan (1:1) setelah itu fase etil asetat dipisahkan dengan corong pemisah, kemudian diuapkan pada *rotary evaporator* pada suhu 50-60 °C, lalu tuang destilat pada *cawan porselin* dan di uapkan pada *waterbath* dengan suhu 50°C (Syarifuddin et al., 2019).

8. Uji Kolmatografi Lapis Tipis (KLT)

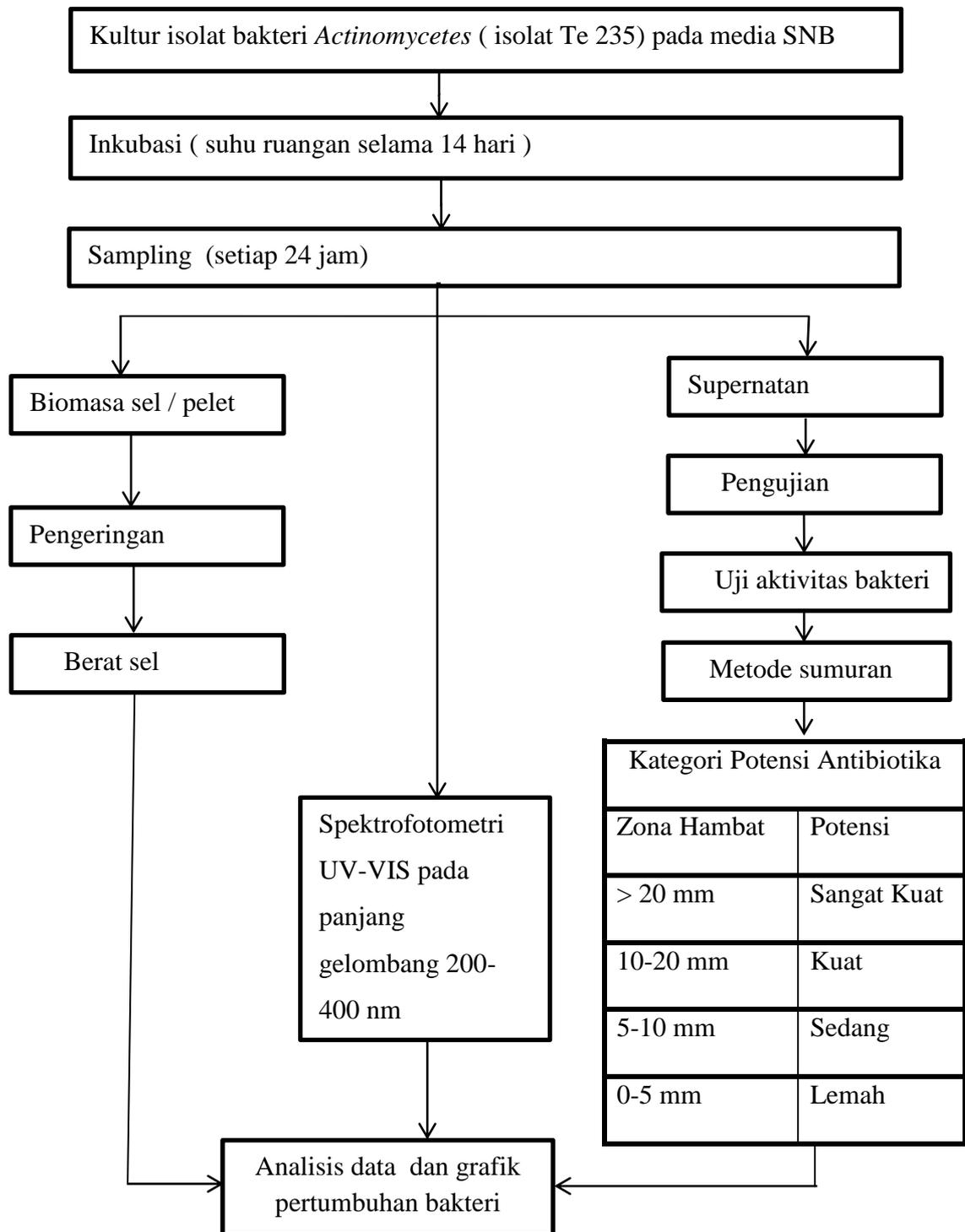
Uji KLT dilakukan dengan cara Ekstrak isolat TE 235 ditotolkan pada plat silika gel F254 sebagai fase diamnya dengan ukuran 1 cm x 10 cm, selanjutnya diberi penanda garis pada tepi bawah plat diberi jarak 1 cm untuk menunjukkan posisi awal totolan, penanda garis pada tepi atas plat di beri jarak 1 cm untuk menunjukkan batas proses elusi, kemudian dikembangkan dengan fase gerak yang sesuai untuk pemisahan senyawa-senyawa yang terdapat dalam ekstraksi, menggunakan fase gerak kloroform : Metanol (7:3), sebelumnya dilakukan pengelmuji dengan cara eluen dalam bejana di jenuhkan terlebih dahulu setiap campuran fase gerak dimasukkan kedalam *great chamber* lalu di

tutup rapat dan di lakukan penjuhan semala 1 jam. Ekstraksi ditotolkan pada jarak 1 cm dari tepi bawah dengan menggunakan pipa kapiler 5 µL, selanjutnya di elusi dengan fase gerak dimana plat dimasukkan kedalam *great chamber* yang berisi fase gerak yang telah jenuh kemudian plat di angkat dan di keringkan dengan dianginanginkan. Bercak pada plat KLT dimonitor di bawah lampu UV 254 nm dan UV 365 nm kemudian hitung nilai Rf (Sopiah et al., 2019).

$$Rf = \frac{\text{Jarak titik pusat bercak}}{\text{Jarak rambat fase gerak}}$$

9. Desain Penelitian

Jenis dan rancangan dari penelitian ini adalah penelitian eksperimental di bidang Mikrobiologi Farmasi dan dilakukan di Laboratorium Farmasi Universitas Muhammadiyah Magelang. Sampel penelitian yang digunakan adalah biomasa sel dan larutan uji (supernatan). Pengujian dengan aktivitas bakteri menggunakan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Pengujian menggunakan spektrofotometri UV-VIS untuk mengetahui pola pertumbuhan bakteri *Actinomyces Isolat TE 235* karena banyaknya jumlah sel pada bakteri *Actinomyces* di dalam kultur uji berbanding lurus dengan besarnya absorbansi.



Gambar 3.1 Desain Penelitian

10. Analisis Data

Analisis data optimasi pertumbuhan dan uji aktivitas antibakteri yang diperoleh di uji menggunakan uji statistika (SPSS) untuk melihat apakah ada perbedaan efektifitas yang bermakna dari masing-masing larutan uji pada hari 1-14 isolat TE 235 dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli*.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN

Hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa

1. Bakteri *Actinomycetes* berdasarkan berat sel memiliki pertumbuhan optimal pada hari ke-9.
2. Bakteri *Actinomycetes* berdasarkan Spektrofotometri UV-VIS memiliki pertumbuhan optimal pada hari ke-9.
3. Pemanenan metabolit sekunder (antibiotik) cairan kultur isolat *Actinomycetes* (isolat TE 235) yang optimal berdasarkan uji aktivitas terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* setelah diinkubasi selama 10 hari dengan diameter zona hambat 6,67 mm, sedangkan terhadap bakteri *Escherichia coli* pemanenan yang optimal setelah diinkubasi selama 7 hari dengan diameter zona hambat 10 mm.

B. SARAN

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai optimasi produksi metabolit sekunder yang berdasarkan media sebagai sumber nutrisi, variasi suhu, dan variasi kecepatan putar sentrifugasi.
2. Perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai *sequencing* DNA untuk mengetahui strain dari isolat *Actinomycetes* (isolat TE 235).

DAFTAR PUSTAKA

- Alen, Y., Agresa, F. L., & Yuliandra, Y. (2017). Analisis Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Aktivitas Antihiperurisemia Ekstrak Rebung *Schizostachyum brachycladum* Kurz (Kurz) pada Mencit Putih Jantan. *Jurnal Sains Farmasi & Klinis*, 3(2), 146–152. <https://doi.org/p- ISSN: 2407-7062>
- Alimuddin, Widada, J., Asmara, W., & Mustofa. (2011). Antifungal Production of a Strain of Actinomycetes spp Isolated from the Rhizosphere of Cajuput Plant : Selection and Detection of Exhibiting Activity Against Tested Fungi. *Journal of Biotechnology*, 16(1), 1–10.
- Andriani, R. (2016). Pengenalan Alat-Alat Laboratorium Mikrobiologi Untuk Mengatasi. *Jurnal Mikrobiologi*, 1(1). <https://doi.org/ISSN : 01A114084> bersifat
- Aziz, G. (2017). *Uji Aktivitas Antibakteri Dan Antioksidan Dari Ekstrak Etil Asetat Kapang Endofit Daun Tanaman Bakung Rawa (Crinum (J. Thomps) Dandy)* (Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah Jakarta). Retrieved from [http://repository.uinjkt.ac.id/dspace/bitstream/123456789/37389/1/GHIFARI L AZIZ-FKIK.pdf](http://repository.uinjkt.ac.id/dspace/bitstream/123456789/37389/1/GHIFARI%20L%20AZIZ-FKIK.pdf)
- Bouras, N., Atika, M., Toumatia, O., Mokrane, S., Holtz, M. D., Strelkov, S. E., & Sabaou, N. (2013). Bioactive potential of a new strain of *Streptomyces* sp . PP14 isolated from Canadian soil. *African Journal of Microbiology Research*, 7(25), 3200–3208. <https://doi.org/10.5897/AJMR12.767>
- Dewi, A. K. (2013). Isolasi , Identifikasi dan Uji Sensitivitas *Staphylococcus aureus* terhadap Amoxicillin dari Sampel Susu Kambing Peranakan Ettawa (PE) Penderita Mastitis Di Wilayah Girimulyo , Kulonprogo , Yogyakarta. *Sain Veteriner*, 31(2), 138–150. Retrieved from <http://jsv.fkh.ugm.ac.id>
- Febrianasari, F. (2018). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Kirinyu terhadap *Staphylococcus aureus*. Universitas Sanata Darma.
- Hikmawati. (2018). *Aktivitas Antibakteri Metabolit Sekunder Isolat Actinomycetes Kc 3.1 Dari Rizosfer Kumis Kucing (Orthosiphon stamineus)*. universitas hasanuddin makasar.
- Indrawati, I., & Rizki, A. F. M. (2017). Potensi Ekstrak Buah Buni (*Antidesma bunius* L) Sebagai Antibakteri Dengan Bakteri Uji *Salmonella thypimurium* Dan *Bacillus cereus*. *Jurnal Biodjati*, 2(2), 138–148. Retrieved from <http://journal.uinsgd.ac.id/index.php/biodjati%0APOTENSI>
- Jawa, T. (2016). *Mutans, Uji Daya Hambat Antibakteri Ekstrak Umbi Bawang*

Merah (Allium ascalonicum L.) Terhadap Pertumbuhan Bakteri Pembentuk Karies Gigi Streptococcus (skripsi). universitas Sanata Dhrama Yogyakarta.

- Maataoui, H., Iraqui, M., Jihani, S., Ibsouda, S., & Haggoud, A. (2014). *Isolation , characterization and antimicrobial activity of a Streptomyces strain isolated from deteriorated wood compounds.* 8(11), 1178–1186. <https://doi.org/10.5897/AJMR2013.6444>
- Masda, N. R. (2018). *Potensi Metabolit Sekunder Isolat Actinomycetes SM-2 Dari Rizofer Andrographis Paniculata Sebagai Penghasil Senyawa Antibakteri.* Universitas Hasanuddin Makasar.
- Mulyadi, ., & Sulistyani, N. (2013). Aktivitas Cairan Kultur 12 Isolat Actinomycetes Terhadap Bakteri Resisten. *Jurnal Kesehatan Masyarakat (Journal of Public Health)*, 7(2), 89–96. <https://doi.org/10.12928/kesmas.v7i2.1043>
- Naid, T., Kasim, S., Marzuki, A., & Sumarheni. (2013). Produksi Antibiotika Secara Fermentasi Dari Biakan Mikroorganisme Symbion Rumput laut *Eucheuma cottonii*. *Majalah Farmasi Dan Farmakologi*, 17(3), 61–68.
- Nanjwade, B. (2010). Production of antibiotics from soil-isolated actinomycetes and evaluation of their antimicrobial activities. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 9(4), 373–377. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v9i4.58933>
- Nugrahani, R. (2013). *Potensi Antibiotik Isolat Actinomycetes Dari Material Vulkanik Gunung Merapi Erupsi Tahun 2010 Terhadap Candida albicans Naskah Publikasi* (Fakultas pegruruan dan ilmu pendidikan unviversitas muhammadiyah surakarta). Retrieved from <http://www.ums.ac.id>
- Nurkanto, A., & Agusta, A. (2015a). Identifikasi Molekular dan Karakterisasi Morfo-Fisiologi Actinomycetes Penghasil Senyawa Antimikroba (Molecular Identification and Morpho-Physiological Characterization of Actinomycetes with Antimicrobial Properties). *Jurnal Biologi Indonesia*, 11(2), 195–203.
- Nurkanto, A., & Agusta, A. (2015b). Molecular Identification and Morpho-Physiological Characterization of Actinomycetes with Antimicrobial Properties Identifikasi Molekular dan Karakterisasi Morfo - Fisiologi Actinomycetes Penghasil Senyawa Antimikroba (Molecular Identification and Morpho. *Jurnal Biologi Indonesia*, 2(January), 195–203.
- Nydia, V. (2016). *Perbedaan Bakteri Gram Positif Dan Gram Negati* (Universitas Muhammadiyah Semarang). Retrieved from <https://docplayer.info/35015574-Perbedaan-bakteri-gram-positif-dan-gram-negatif.html>

- Padoli. (2016). *mikrobiologi dan parasitologi keperawatan*. jakarta: kementerian kesehatan republik indonesia.
- Poeloengan, M., & Praptiwi. (2010). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana* Linn). *Media Litbang Kesehatan Volume*, xx(30), 65–69.
- Pratiwi, arini eka. (2015). *Isolasi, Seleksi Dan Uji Aktivitas Antibakteri Mikroba Endofit Dari Daun Tanaman Garcinia benthami Pierre Terhadap Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Escherichia coli, Shigella dysenteriae dan Salmonella typhimurium* (universitas islam negeri syarif hidayatul jakarta). Retrieved from https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&url=http://repository.uinjkt.ac.id/dspace/bitstream/123456789/38039/1/ARINI%2520EKA%2520PRATIWI-FKIK.pdf&ved=2ahUKEwiBm9SIzerkAhX_8XMBHQfxA4EQFjACegQIBhAB&usg=AOvVaw1vsee1vst0Mmd86_t_PGmu
- Prayogo, E. (2013). *Perbandingan Efek Ekstrak Daun Sirih Hijau (Piper Betle L .) Dengan Metode Difusi Disk Dan Sumuran Terhadap Pertumbuhan Bakteri Staphylococcus Aureus*. Islam Negeri Syarif Hidayatullah Jakarta.
- Radji, M. (2011). *Buku Ajar Mikrobiologi Panduan Mahasiswa Farmasi & Kedokteran*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran.
- Ramadhan, H. (2019). Isolasi Actinomycetes Penghasil Antibiotik Terhadap *Escherichia coli* Dan *Staphylococcus aureus* Dari Tanah Sawah. *Jurnal Stikes Borneo Lestari Banjar Baru*, 50–64. Retrieved from <http://www.jurnalstikesborneolestari.ac.id/index.php/herbal/article/view/110>
- Ramadhani, M. A., & Sulistyan, N. (2018). Uji Aktivitas Isolat Actinomycetes (Kode Gst, Kp, Kp11, Kp16, T24, Dan T37) Terhadap *Staphylococcus aureus* Atcc 25923 Dan *Escherichia coli* Atcc 25922. 01(02), 29–37. <https://doi.org/NOISSN : 2615-6903>
- Ramadhani, M. aprilliana, & Sulistyan, N. (2018). Uji Aktivitas Isolat Actinomycetes (Kode Gst, Kp, Kp11, Kp16, T24, Dan T37) Terhadap *Staphylococcus aureus* Atcc 25923 Dan *Escherichia coli* Atcc 25922. *Indonesian Journal of Pharmacy and Natural Product*, 01(02), 29–37.
- Salim, C. H., Senandi, E. E., & Fitria, R. M. (2016). Aktivitas Antibiotik Ekstrak Mikroba Actinomycetes Yang Diisolasi Dari Perairan Laut Kepulauan Seribu Provinsi Jakarta Terhadap Mycobacteria. *PKM-Artikel Ilmiah*, 1–9. <https://doi.org/Universitas Esa Unggul>
- Sopiah, B., Muliastari, H., & Yuanita, E. (2019). Skrining Fitokimia dan Potensi Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Hijau dan Daun Merah Kastuba (

- Phytochemical Screening and Potential Antioxidant Activity of Ethanol Ekstract of Green Leaves and Red Leaves Kastuba). *Jurnal Ilmu Kefarmasian*, 17(1), 27–33.
- Suharti, T. (2017). *Dasar - Dasar Spektrofotometri Uv-Vis Dan Spektrofotometri Massa Untuk Penentuan Struktur Senyawa Organik*. Lampung: Aura (Anugrah Utama Raharja).
- Sulistiyani, N., & Akbar, A. nuryadin. (2014). Aktivitas Isolat Actinomycetes dari Rumput Laut (*Eucheuma cottonii*) sebagai Penghasil Antibiotik terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 12(1), 1–9. Retrieved from 1-9_Nanik Sulistiyani_Actinomycetes.indd
- Sulistiyani, N., & Narwanti, I. I. N. (2015). Aktivitas Cairan Kultur Bakteri Penghasil Antibiotik (Isolat P301) terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan Optimasi Waktu Produksi Metabolit Sekunder. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 13(2), 181–186. <https://doi.org/ISSN 1693-1831>
- Sutiknowati, L. I. (2016). Bioindikator pencemar, bakteri. *Oseana*, XLI(4), 63–71. <https://doi.org/ISSN 0216-1877>
- Syarifuddin, A., Kamal, S., Yulastuti, F., Pradani, M. P. K., & Septianingrum, N. M. A. N. (2019). Ekstraksi Dan Identifikasi Metabolit Sekunder Dari Isolat AL 6 Serta Potensinya Sebagai Antibakteri Terhadap *Escherichia coli*. *Biotrknologi & Biosains Indonesia*, 6(2), 210–218. [https://doi.org/ISSN 2548 – 611X](https://doi.org/ISSN 2548 - 611X)
- Syarifuddin, A., & Sulistiyani, N. (2019). Karakterisasi Fraksi Teraktif Senyawa Antibiotik Isolat KP 13 Dengan Metode Densitometri Dan KLT- Semprot. *Jurnal Ilmiah Ibnu Sina*, 4(1), 156–166. <https://doi.org/10.36387/jiis.v4i1.263>
- Warsi, & Sulistiyani, N. (2018). Optimasi Waktu Produksi Metabolit Sekunder dan Skrining Aktivitas Antibakteri Isolat Actinomycetes Rizosfer Tanaman Tin (*Ficus carica*). *Jurnal Teknologi Laboratorium*, 7(1), 15–24. <https://doi.org/10.29238/teknolabjournal.v7i1.120>
- Wasitaningrum, Ika dyah ayu. (2009). *Uji Resistensi Bakteri Staphylococcus aureus Dan Escherichia coli Dari Isolat Susu Sapi Segar Terhadap Beberapa Antibiotik* (Universitas Muhammadiyah Surakarta). Retrieved from <http://eprints.ums.ac.id/7689>
- Wulandari, S., & Sulistiyani, N. (2016). Pengaruh Media Terhadap Pertumbuhan Isolat Actinomycetes Kode Al 35 Serta Optimasi Produksi Metabolisme Antibakteri Berdasarkan Waktu Fermentasi Dan Ph. *Jurnal Media Farmasi*, 13(2), 186–198. Retrieved from www.journal.uad.ac.id/index.php/Media-

Farmasi/article/view/7770/3846

Wulandari, W., & Rahayu, T. (2015). Aktivitas Antibakteri Isolat Actinomycetes Dari Sampel Pasir Gunung Merapi Dengan Lama Fermentasi Yang Berbeda Terhadap Bakteri *Escherichia coli* Multiresisten Antibiotik. *Bioeksperimen*, 1(2), 53–59. <https://doi.org/ISSN 2460-1365>