

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Hutan Bakau

Hutan bakau merupakan hutan yang terdapat di atas rawa-rawa berair payau yang terletak pada garis pantai dan dipengaruhi oleh pasang-surut air laut.

Hutan ini umumnya tumbuh di tempat-tempat dimana terjadi pelumpuran dan akumulasi bahan organik, baik di teluk-teluk yang terlindung dari gempuran ombak, maupun disekitar muara sungai dimana air melambat dan mengendapkan lumpur yang dibawanya dari hulu (Anwar dkk,1984).



Gambar 1. Hutan Bakau yang terdapat di pantai Ringgung Pesawaran

Lumpur merupakan bagian ekosistem di hutan bakau yang mengandung sejumlah bahan organik, dengan sumber karbon yang menghasilkan bentuk-

bentuk yang kompleks (seperti metabolit sekunder, enzim selulase dan kitinase). Bahan organik tersebut digunakan oleh mikroorganisme sebagai sumber karbon dan nitrogen. Salah satu mikroorganisme tersebut adalah *actinomycetes* (Magarvey *et al.*, 2004; Suryanto dan Yurnaliza, 2005).

B. Actinomycetes

Actinomycetes merupakan organisme peralihan antara jamur dan bakteri. (Alexander, 1997). Organisme ini memiliki sifat-sifat yang umum dimiliki oleh jamur dan bakteri. Terlihat dari luar seperti jamur karena mempunyai hifa bercabang yang membentuk miselium. Miselium pada *actinomycetes* dapat berupa miselium udara dan miselium substrat yang mempunyai spora (Atlas, 1995). *Actinomycetes* menyerupai bakteri karena termasuk kelompok bakteri gram positif yang memiliki dinding sel yang terdiri dari polimer-polimer gula, asam amino dan asam gula (Alexander, 1997). Walaupun demikian *actinomycetes* mempunyai ciri yang khas, yang cukup membatasinya menjadi satu kelompok yang jelas berbeda. Pada lempeng agar, *actinomycetes* dapat dibedakan dengan mudah dari bakteri, dimana koloni bakteri tumbuh dengan cepat dan berlendir, sedangkan *actinomycetes* muncul perlahan dan berbuk serta melekat erat pada permukaan agar. Koloni *actinomycetes* biasanya keras, kasar, dan tumbuh tinggi di atas permukaan medium. Umumnya, *actinomycetes* tidak toleran terhadap asam dan jumlahnya menurun pada pH 5,0. Rentang pH dan suhu yang cocok untuk pertumbuhan *actinomycetes* ini adalah antara 6,5–8,0 dan 25–30⁰C (Rao, 1994).

Actinomycetes diketahui sebagai penghasil metabolit sekunder, sehingga telah banyak penelitian dilakukan untuk mengisolasi *actinomycetes*. Beberapa jenis *actinomycetes* yang telah berhasil diisolasi dan diketahui aktivitas biologisnya antara lain dapat dilihat pada tabel 1.

Table 1. Senyawa metabolit sekunder yang telah diisolasi dan sifat aktivitas biologinya (Jensen *et.al.*, 2006).

No	Senyawa	Nama actinomycetes	Aktivitas biologis	Molekul target
1.	Salinosporamid A	<i>S. tropica</i>	Antikanker	proteasome
2.	Rifamisin	<i>S. arenicola</i>	Antibiotik	RNA polimerase
3.	Staurosporin	<i>S. arenicola</i>	Antikanker	Protein kinase
4.	Saliniketal	<i>S. arenicola</i>	Antikanker	Ornathine Decarboxylase
5.	Siklomarlin A	<i>S. arenicola</i>	Antiinflamasi Antiviral	- -

C. Senyawa Metabolit Sekunder

Suatu mikroorganisme dapat menghasilkan produk metabolisme yang disebut metabolit. Senyawa yang dihasilkan selama fase pertumbuhan primer (tropofase, fase eksponensial atau fase log) disebut metabolit primer contohnya karbohidrat, protein, lemak, asam nukleat, dan enzim. Senyawa yang diproduksi selama fase stasioner disebut metabolit sekunder, contohnya terpenoid, steroid, alkaloid dan flavonoid. (Bajpai *et al*, 1981; Zborowski, 2004). Metabolit sekunder tidak dihasilkan oleh seluruh mikroorganisme, selain itu jenis metabolit sekunder yang terbentuk berbeda antara mikroorganisme satu dengan yang lain. Pembentukan metabolit sekunder

sangat bergantung pada kondisi pertumbuhan, terutama komposisi medium. Metabolit sekunder hanya diproduksi dalam jumlah sedikit. Fungsi senyawa metabolit sekunder pada organisme diantaranya untuk bertahan terhadap predator, kompetitor dan untuk mendukung proses reproduksi (Faulkner, 2000).

Salah satu golongan senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada *actinomycetes* yaitu dari golongan alkaloid (Jensen *et al.*, 1991, Gorajana *et al.*, 2005; Onaka, 2006)

D. Senyawa alkaloid

Alkaloid merupakan golongan senyawa metabolit sekunder terbesar dan diperkirakan ada 5500 alkaloid telah diketahui jenisnya. Tidak ada satu pun definisi yang memuaskan tentang alkaloid, tetapi alkaloid umumnya mencakup senyawa-senyawa bersifat basa yang mengandung satu atau lebih atom nitrogen, biasanya sebagai bagian dari sistem siklik. Secara kimia, alkaloid adalah golongan yang sangat heterogen berkisar dari senyawa-senyawa yang sederhana seperti *coniine* sampai ke struktur pentasiklik *strychnine*. Sebagai hasil metabolit sekunder, senyawa alkaloid berguna sebagai cadangan bagi biosintesis protein, pelindung, penguat dan pengatur kerja hormon (Harborne, 1984; Bhakuni and Rawat, 2005)

Sifat – sifat alkaloid :

- a. Biasanya merupakan kristal tak berwarna, tidak mudah menguap, tidak larut dalam air, larut dalam pelarut organik. Beberapa alkaloid berwujud cair dan larut dalam air. Ada juga alkaloid yang berwarna, misalnya berberin (kuning).
- b. Bersifat basa (pahit, racun).
- c. Mempunyai efek fisiologis
- d. Dapat membentuk endapan dengan asam fosfomolibdat, asam pikrat, dan kalium merkuriiodida. (Tobing, 1989)

Hingga kini belum ada penggolongan yang jelas dari alkaloid. Menurut, Matsjeh (2002) alkaloid diklasifikasikan berdasarkan lokasi atom nitrogen di dalam struktur alkaloid.

Berdasarkan lokasi atom nitrogen di dalam struktur alkaloid, alkaloid dapat dibagi atas 5 golongan:

1. Alkaloid heterosiklik
2. Alkaloid dengan nitrogen eksosiklik dan amina alifatik
3. Alkaloid putressina, spermidina, dan spermina
4. Alkaloid peptida
5. Alkaloid

Dari lima golongan di atas, alkaloid heterosiklik adalah yang terbesar. Yang termasuk pada golongan ini adalah:

1. Alkaloid piridin-piperidin

Alkaloid piridin-piperidin mempunyai satu cincin karbon mengandung 1 atom nitrogen.

2. Alkaloid tropan

Alkaloid tropan mengandung satu atom nitrogen dengan gugus metilnya (N-CH₃), dengan struktur inti:

3. Alkaloid kuinolin

Alkaloid quinolin mempunyai 2 cincin karbon dengan 1 atom nitrogen.

4. Alkaloid isokuinolin

Alkaloid isoquinolin mempunyai 2 cincin karbon mengandung 1 atom nitrogen.

5. Alkaloid indol

Alkaloid indol mempunyai 2 cincin karbon dengan 1 cincin indol.

6. Alkaloid imidazol

Alkaloid imidazol berupa cincin karbon mengandung 2 atom nitrogen

7. Alkaloid lupinan

Alkaloid lupinan mempunyai 2 cincin karbon dengan 1 atom N, dengan struktur inti:

8. Alkaloid steroid

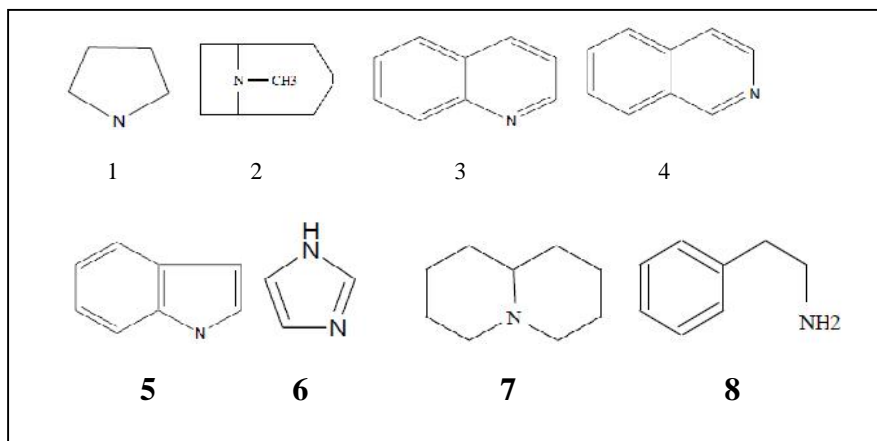
Alkaloid steroid mengandung 2 cincin karbon dengan 1 atom nitrogen dan 1 rangka steroid yang mengandung 4 cincin karbon.

9. Alkaloid amina

Alkaloid amina golongan ini tidak mengandung N heterosiklik. Banyak yang merupakan turunan sederhana dari feniletilamin dan senyawa-senyawa turunan dari asam amino fenilalanin atau tirosin.

10. Alkaloid purin

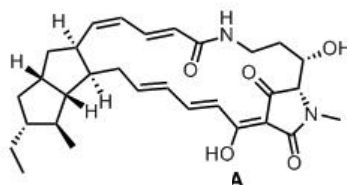
Alkaloid purin mempunyai 2 cincin karbon dengan 4 atom nitrogen.



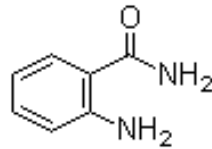
Gambar 2. Struktur jenis-jenis alkaloid (1. Pirolidin, 2. Tropen, 3. Kuinolin, 4. Isokuinolin, 5. Indol, 6. Imidazol, 7. Lupinan, 8. Feniletilamina)

Senyawa-senyawa alkaloid yang telah berhasil diisolasi dari *actinomycetes* menunjukkan aktivitas biologis diantaranya:

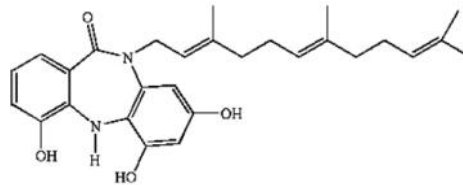
1. Senyawa aburatubolaktam memiliki aktivitas sebagai antiperadangan dan antipenuaan (Kuramoto et al, 2004)



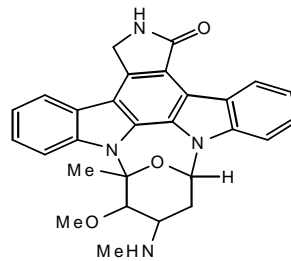
2. Senyawa anthranilamid yang telah diisolasi dari actinomycetes laut yang memiliki aktivitas konsentrasi inhibitor minimum 20-107 $\mu\text{g/ml}$ melawan mikroalga (Biabani et al., 1997).



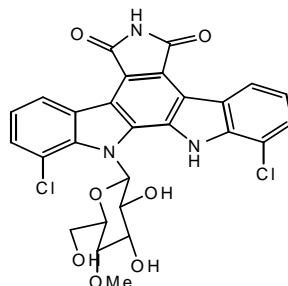
3. Senyawa diazepinomicin memiliki aktivitas sebagai antibakteri, antikanker dan antiinflamasi (Lam, 2006)



4. Senyawa stourosporin memiliki aktivitas sebagai obat antitumor (Onaka, 2006).



5. Senyawa rebekkamisin sebagai inhibitor protein kinase (Onaka, 2006).



E. Isolasi Dan Karakterisasi Senyawa Alkaloid

1. Ekstraksi

Ekstraksi merupakan suatu metode pemisahan berdasarkan perbedaan distribusi senyawa sampel dalam dua pelarut yang tidak saling melarut. Salah satu langkah penting yang menentukan keberhasilan ekstraksi adalah pemilihan pelarut (Haslego,2004)

Syarat-syarat untuk pelarut dalam ekstraksi:

- tidak dapat bercampur dengan air
- memiliki kerapatan yang berbeda dengan air
- karakteristik kelarutannya
- kestabilan dan volatilitas yang baik sehingga dapat dengan mudah dilepaskan dari senyawa organik dengan cara penguapan
- tidak beracun dan tidak mudah terbakar, tetapi kedua syarat ini sulit untuk dipenuhi.

Ekstraksi digolongkan kedalam dua bagian besar berdasarkan pada bentuk fasa yang diekstraksi yaitu ekstraksi cair-cair dan ekstraksi cair-padat. Untuk ekstraksi cair-cair dapat menggunakan corong pisah, sedangkan untuk ekstraksi cair-padat terdiri dari beberapa cara yaitu maserasi, perkolasi dan, sokletsi (Harborne, 1984).

2. Kromatografi lapis tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis merupakan metoda kromatografi cair yang melibatkan dua fasa yaitu fasa diam dan fasa gerak. Fasa geraknya berupa campuran pelarut pengembang dan fasa diamnya dapat berupa serbuk halus yang berfungsi sebagai permukaan penyerap (kromatografi cair-padat) atau berfungsi sebagai penyangga untuk lapisan zat cair (kromatografi cair-cair). Fasa diam (adsorben) yang sering digunakan adalah serbuk silika gel, alumina dan selulosa yang mempunyai ukuran butir sangat kecil, yaitu 0,063-0,125 mm. Fasa diam yang umum digunakan adalah silika gel yang dapat dipakai untuk memisahkan campuran senyawa lipofil maupun campuran senyawa hidrofil (Hostettman dkk., 1995).

Kromatografi lapis tipis dapat digunakan untuk keperluan yang luas dalam pemisahan-pemisahan. Disamping memberikan hasil pemisahan yang lebih baik, juga membutuhkan waktu yang lebih cepat. Kromatografi lapis tipis hanya membutuhkan cuplikan dalam jumlah sedikit dan noda-noda yang terpisahkan dilokalisir pada plat. Metode lapis tipis mempunyai keuntungan yang utama yaitu membutuhkan waktu yang lebih cepat dan diperoleh pemisahan yang lebih baik. Waktu rata-rata untuk kromatografi lapis tipis

dengan panjang 10 cm pada silika gel adalah sekitar 20-30 menit (tergantung sifat fase gerak) (Sastrohamidjojo, 1991).

Menurut Gritter (1991), penampakan bercak pada KLT dapat diidentifikasi dengan menghitung harga R_f (*Retardation Factor*) yaitu :

$$R_f = \frac{\text{Jarak perjalanan suatu senyawa}}{\text{Jarak perjalanan suatu eluen}}$$

Harga R_f komponen murni dapat dibandingkan dengan harga R_f senyawa standar, karena pada kondisi tertentu suatu senyawa akan memiliki harga R_f yang sama. Harga R_f ini bergantung pada beberapa parameter yaitu sistem pelarut, adsorben (ukuran butir, ketebalan), jumlah bahan yang ditotolkan pada plat, dan suhu (Khopkar, 2002).

3. Kromatografi kolom

Kromatografi kolom digunakan untuk mendapatkan hasil zat murni secara preparatif dari campuran beberapa senyawa yang diperoleh dari hasil isolasi. Dalam kromatografi kolom campuran terpisah dalam zona-zona warna yang berbeda dalam tiap pelarut. Untuk kromatografi kolom dari larutan dibutuhkan tabung pemisah tertentu yang diisi dengan bahan sorpsi dan juga pelarut pengembang yang berbeda. Tabung pemisah yang diisi dengan bahan sorpsi disebut kolom pemisah (Kisman dan Ibrahim, 1998).

Pada dasarnya kromatografi kolom ini meliputi penempatan campuran suatu senyawa diatas kolom yang diisi serbuk penyerap (silika gel), kemudian dielus beruntun dengan pelarut yang sesuai. Pelarut tersebut akan mengangkut

senyawa-senyawa yang merupakan komponen dari campuran dan kecepatan daya pisah bergantung pada besarnya komponen terhambat dalam kolom (Johnson dan Stevenson, 1991).

4. Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT)

Kromatografi Cairan Kinerja Tinggi (KCKT) merupakan salah satu teknik kromatografi untuk zat cair yang biasanya disertai dengan tekanan tinggi.

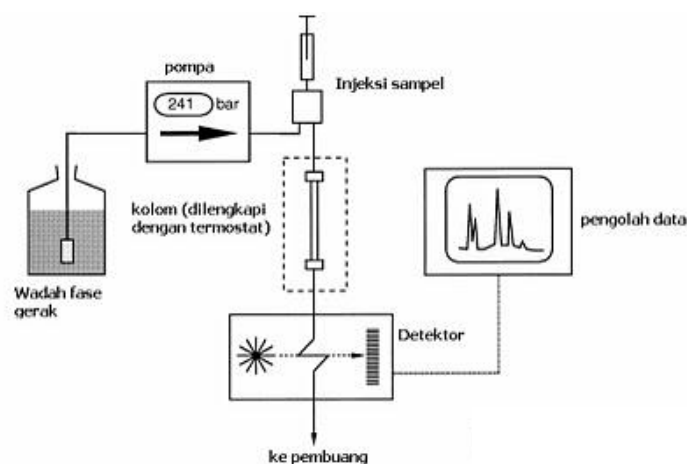
KCKT secara mendasar merupakan perkembangan tingkat tinggi dari kromatografi kolom. Selain dari pelarut yang menetes melalui kolom dibawah gravitasi, didukung melalui tekanan tinggi sampai dengan 400 atm.

KCKT merupakan suatu kromatografi yang memiliki fungsi sama dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan kromatografi kolom yaitu untuk mengetahui hasil analisis kualitatif, analisis kuantitatif, menentukan jumlah komponen campuran, mengidentifikasi komponen, namun penggunaan KCKT memiliki keuntungan yaitu hasil keluarannya berupa kromatogram.

Berdasarkan polaritas relative fasa gerak dan fasa diamnya, KCKT dibagi menjadi dua, yaitu fasa normal yang umum digunakan untuk identifikasi senyawa nonpolar dan fasa terbalik yang umum digunakan untuk identifikasi senyawa polar. Pada fasa normal, fasa gerak yang digunakan kurang polar dibandingkan fasa diam. Sedangkan pada fase terbalik, fasa gerak lebih polar dibandingkan fasa diam (Gritter dkk, 1991).

Cara kerja KCKT sebagai berikut: dengan bantuan pompa fasa gerak cair dialirkan melalui kolom ke detektor. Sampel dimasukkan ke dalam aliran fasa gerak dengan cara penyuntikan. Di dalam kolom terjadi pemisahan komponen-

komponen campuran. Karena perbedaan kekuatan interaksi antara zat terlarut terhadap fasa diam. Zat terlarut yang kurang kuat interaksinya dengan fasa diam akan keluar dari kolom lebih dulu. Sebaliknya, zat terlarut yang kuat berinteraksi dengan fasa diam akan keluar dari kolom lebih lama. Setiap komponen campuran yang keluar kolom dideteksi oleh detektor yang kemudian direkam dalam bentuk kromatogram (Anwar, 1994).

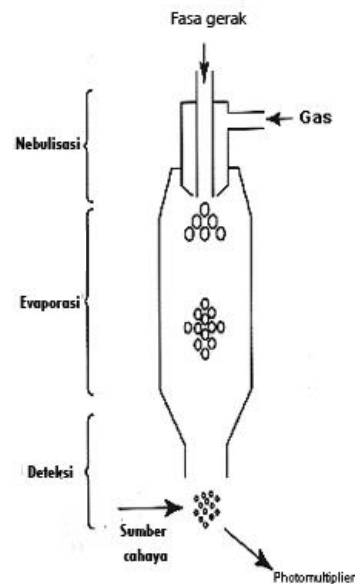


Gambar 8. Diagram alat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) (Anwar, 1994)

Metode yang digunakan untuk mendeteksi substansi yang telah melewati kolom KCKT pada penelitian ini digunakan ELSD (*Evaporative Light Scattering Detection*) yaitu, detektor hamburan cahaya menguapkan yang dapat digunakan untuk mendeteksi analit dengan berbagai panjang gelombang. Pada detektor ini sampel yang akan dideteksi harus melalui 3 tahap yaitu:

- a. Nebulisasi merupakan langkah pertama untuk mengubah seluruh fasa gerak yang mengalir dari kolom KCKT dengan bantuan gas nitrogen menjadi butiran halus atau disebut dengan aerosol.

- b. Evaporasi (penguapan) merupakan langkah kedua setelah fasa gerak diubah menjadi aerosol yang dibawa oleh aliran gas ke daerah panas yang terletak sebelum ruang deteksi. Pelarut akan diuapkan untuk menghasilkan partikel zat terlarut murni.
- c. Deteksi dimana partikel-partikel sampel akan ditembakkan dengan sumber cahaya, jumlah cahaya yang tersebar yang diukur dengan menggunakan fotomultiplier dan perangkat elektronik.



Gambar 9. Diagram detektor *Evaporative Light Scattering Detection* (ELSD) (http://www.sedere.com/writable/versions/sedere/applications/index-upload-ELSD_Biblio_2010.pdf)

F. Bakteri

Bakteri adalah mikroorganisme bersel tunggal tidak terlihat oleh mata, berukuran antara 0,5–10 μm dan lebar 0,5-2,5 μm tergantung pada jenisnya. Terdapat beribu jenis bakteri, tapi hanya beberapa jenis bakteri yang

ditemukan, diantaranya berbentuk coccus, batang, spiral, vibrio (Buckel dkk., 1987).

Bentuk dan ukuran bakteri ada beberapa macam, antara lain :

- a. Bentuk basil : lebar 0,3 -1 μ m, panjang 1,5 – 4 μ m
- b. Bentuk *coccus* : ukuran tengahnya rata-rata 1 μ m
- c. Bentuk spiral : lebar 0,5 -1 μ m, panjang 2-5 μ m, kadang sampai 10 μ m
- d. Bentuk *vibrio* : lebar 0,5 μ m, panjang sampai 3 μ m
- e. Bentuk *spirocheta* : lebar 0,2 -0,7 μ m, panjang 5 -10 μ m. (Adam, 1995)

Secara garis besar bakteri dibedakan berdasarkan perbedaan komposisi dinding selnya yaitu: bakteri gram positif dan gram negatif.

1. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus merupakan bakteri Gram positif berbentuk bulat biasanya tersusun dalam bentuk menggerombol yang tidak teratur seperti anggur.

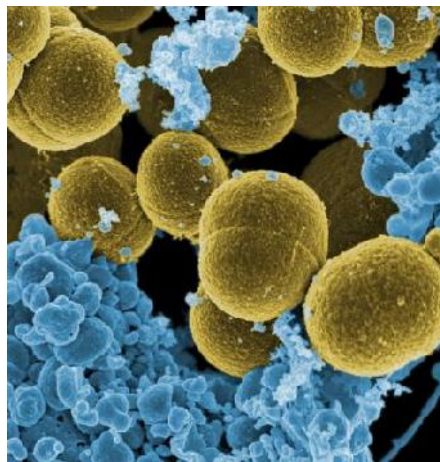
Staphylococcus bertambah dengan cepat pada beberapa tipe media dengan aktif melakukan metabolisme, melakukan fermentasi karbohidrat dan menghasilkan bermacam-macam pigmen dari warna putih hingga kuning gelap.

Staphylococcus cepat menjadi resisten terhadap beberapa antimikroba (Jawetz, *et al.*, 2001).

Klasifikasi *Staphylococcus aureus* :

- Kingdom : *Protozoa*
- Divisio : *Schyzomycetes*
- Class : *Schyzomycetes*

- Ordo : *Eubacteriales*
- Family : *Micrococcaceae*
- Genus : *Staphylococcus*
- Species : *Staphylococcus aureus* (Salle, 1961)



Gambar 10. Bakteri *Staphylococcus aureus*
(<http://millicent.blogdetik.com/2010/06/04/keyboard-sumber-bakteri>)

Staphylococcus tumbuh dengan baik pada berbagai media bakteriologi dibawah suasana aerobik atau mikroaerofilik. Tumbuh dengan cepat pada temperatur 20 -35°C. Koloni pada media padat berbentuk bulat, lambat dan mengkilat (Jawetz, *et al.*, 2001).

Staphylococcus aureus mempunyai 4 karakteristik khusus, yaitu faktor virulensi yang menyebabkan penyakit berat pada normal hast, faktor differensiasi yang menyebabkan penyakit yang berbeda pada sisi atau tempat berbeda, faktor persisten bakteri pada lingkungan dan manusia yang membawa gejala karier, dan faktor resistensi terhadap berbagai antibiotik yang

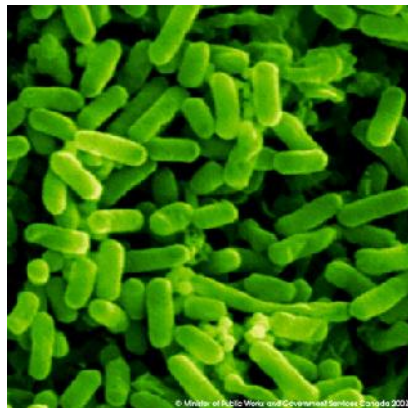
sebelumnya masih efektif (Spicer, 2000). *Staphylococcus aureus* menghasilkan katalase yang mengubah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen (Jawetz, *et al.*, 2001).

2. *Escherichia coli*

Organisme ini tersebar luas di alam biasanya lazim terdapat dalam sel pencernaan manusia dan hewan. Dalam Merchant dan Parker (1961) disebutkan spesies *E. coli* tidak dapat mengurangi asam sitrat dan garam asam sitrat sebagai sumber karbon tunggal dan tidak menghasilkan pigmen, tetapi kadang-kadang menghasilkan pigmen berwarna kuning.

Klasifikasi *Escherichia coli* :

- Divisio : *Schizomycota*
- Kelas : *Schizomycetec*
- Ordo : *Eubacteriaceae*
- Genus : *Escherichia*
- Species : *Escherichia coli* (Salle, 1961)



Gambar 11. Bakteri *Escherichia coli*
[\(http://dokterternak.com/2011/05/31/penyakit-colibacillosis-akibat-bakteri-e-coli-pada-ayam/\)](http://dokterternak.com/2011/05/31/penyakit-colibacillosis-akibat-bakteri-e-coli-pada-ayam/)

E. coli tersebar diseluruh dunia dan ditularkan bersama air atau makanan yang terkontaminasi oleh feses. *Escherichia coli* berbentuk batang, tebal 0,5 μ m; panjang antara 1,0 -3,0 μ m; bervariasi dari bentuk koloid sampai berbentuk seperti filamen yang panjang; tidak berbentuk spora; motil dan filamen perithin beberapa galur tidak memiliki flagella; bersifat Gram negatif (Merchant dan Parker, 1961).

E. coli bersifat aerob atau kualitatif anaerob, dapat tumbuh pada media buatan. Beberapa sifat *E. coli* antara lain pertumbuhan optimum pada suhu 37°C, dapat tumbuh pada suhu 15°C -45°C, tumbuh baik pada pH 7,0 tapi tumbuh juga pada pH yang lebih tinggi (Merchant dan Parker, 1961).

Koloni terlihat basah, mengkilat, tidak bening, bulat dan dengan tepi yang terlihat halus dan rata. Koloni muda terlihat granuler halus dan makin tua menjadi granuler kasar. *Escherichia coli* menghasilkan asam dan gas dari glukosa, laktosa, fruktosa, maltosa, arabinosa, xylosa, rhamnosa dan manitol; dapat atau tidak memfermentasi sukrosa, rafinosa, salisin, eskulin, dulsitol dan

gliserol; bervariasi dalam memfermentasi sakrosa dan salisin, pektin dan adonitol jarang difermentasikan; dekstrin, pati dan glikogen dan inositol tidak pernah difermentasikan (Merchant dan Parker, 1961).

Escherichia coli menghasilkan katalase, tidak mencairkan gelatin, membentuk indol, mereduksi nitrat, mengoksidasi dan mengasamkan air susu tanpa peptonisasi, mengoksidasi kentang sehingga berwarna coklat gelap, tidak menghasilkan gas H₂S (Merchant dan Parker, 1961).

G. Uji Antibakteri

Antibakteri adalah zat yang menghambat pertumbuhan bakteri dan digunakan secara khusus untuk mengobati infeksi (Pelczar dan Chan 1986).

Pengukuran aktivitas antibakteri menurut Jawetz (1986) meliputi 2 cara yaitu:

1. Dilusi

Pada prinsipnya antibiotik diencerkan hingga diperoleh beberapa konsentrasi. Metode yang dipakai ada dua macam, yaitu metode dilusi kaldu disebut juga dengan dilusi cair dan metode dilusi agar atau dilusi padat. Pada dilusi cair, masing-masing konsentrasi obat ditambah suspensi kuman atau bakteri dalam media. Sedangkan dalam dilusi padat, tiap konsentrasi obat dicampur dengan media agar, lalu ditanami bakteri (Brander et al., 1991).

Pertumbuhan bakteri ditandai oleh adanya kekeruhan setelah 16-20 jam diinkubasi. Konsentrasi terendah yang menghambat pertumbuhan bakteri ditunjukkan dengan tidak adanya kekeruhan, dan disebut dengan Konsentrasi

Hambat Minimal (KHM). Masing-masing konsentrasi antibiotik yang menunjukkan hambatan pertumbuhan ditanam pada agar padat media pertumbuhan bakteri dan diinkubasi. Konsentrasi terendah dari antibiotik yang membunuh 99,9% inokulum bakteri disebut Konsentrasi Bakterisid Minimal (Brander et al., 1991).

2. Difusi

Media difusi menggunakan kertas disk yang berisi antibiotik dan telah diketahui konsentrasinya. Pada metode difusi, media yang dipakai adalah agar Mueller Hinton. Ada beberapa cara pada metode difusi ini, yaitu :

i. Cara Kirby-Bauer

Cara Kirby-Bauer merupakan suatu metode uji sensitivitas bakteri yang dilakukan dengan membuat suspensi bakteri pada media Brain Heart Infusion (BHI) cair dari koloni pertumbuhan kuman 24 jam, selanjutnya disuspensikan dalam 0,5 ml BHI cair (diinkubasi 4-8 jam pada suhu 37°C) (Jawetz et al., 2001).

Hasil inkubasi bakteri diencerkan sampai sesuai dengan standar konsentrasi kuman 10⁸ CFU/ml (CFU : Coloni Forming Unit). Suspensi bakteri diuji sensitivitas dengan meratakan suspensi bakteri tersebut pada permukaan media agar. Disk antibiotik diletakkan di atas media tersebut dan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 19-24 jam kemudian dibaca hasilnya (Jawetz et al., 2001).

ii. Cara sumuran

Suspensi bakteri 108CFU/ml diratakan pada media agar, kemudian agar tersebut dibuat sumuran dengan garis tengah tertentu menurut kebutuhan.

Larutan antibiotik yang digunakan diteteskan kedalam sumuran. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Dibaca hasilnya, seperti pada cara Kirby-Bauer (Jawetz et al., 2001).

iii. Cara *Pour Plate*

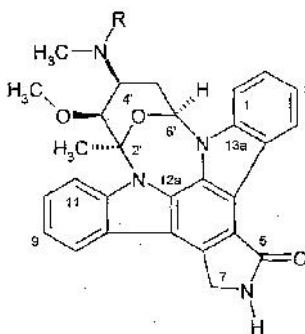
Setelah dibuat suspensi kuman dengan larutan BHI sampai konsentrasi standar (108CFU/ml), lalu diambil satu mata ose dan dimasukkan kedalam 4ml agar base 1,5% dengan temperatur 50°C. Suspensi kuman tersebut dibuat homogen dan dituang pada media agar Mueller Hinton. Setelah beku, kemudian dipasang disk atau ring yang diberi antibiotik (diinkubasi 15-20 jam pada suhu 37°C) dibaca dan disesuaikan dengan standar masing-masing antibiotik (Jawetz et al., 2001).

H. Spektroskopi Infra Merah (IR)

Spektroskopi infra merah adalah suatu metoda analisis yang didasarkan pada penyerapan sinar infra merah. Fungsi utama dari spektroskopi infra merah adalah untuk mengenal struktur molekul (gugus fungsional). Spektroskopi infra merah adalah grafik dari persentasi transmitansi dengan panjang gelombang atau penurunan frekuensi. Tiap lekukan yang disebut gelombang atau puncak menunjukkan adsorpsi dari radiasi inframerah oleh cuplikan pada frekuensi tersebut (Fessenden&Fessenden:1981).

Prinsip kerja dari metode ini adalah apabila sinar dilewatkan melalui cuplikan senyawa organik, maka sejumlah frekuensi yang lain akan diteruskan. Karena atom-atom dalam suatu molekul tidak diam melainkan bervibrasi, maka penyerapan frekuensi (energi ini mengakibatkan terjadinya transisi diantara tingkat vibrasi dasar dan tingkat vibrasi tereksitasi. Metode ini juga digunakan dalam mendeteksi gugus fungsional, mengidentifikasi senyawa dan menganalisis campuran (Day and Underwood, 1989)

Sebagai contoh spektrum serapan IR senyawa alkaloid dari *actinomycetes* yaitu: senyawa *N*-Carboxamido-staurosporine memberikan data serapan IR :
= 2855, 2929, 2359, 2344, 1633, 1458, 1385, 1316, 1282, 1120, 1018 cm^{-1} .
(Wu *et.al*, 2006).



Gambar 12. *N*-Carboxamido-staurosporine