

**ISOLASI DAN UJI AKTIVITAS
ANTIBAKTERI FRAKSI NON POLAR
SPON LAUT *Axinella carteri* TERHADAP
BAKTERI *Ralstonia solanacearum***

SKRIPSI SARJANA FARMASI

Oleh

RAHMAD TAUFIK LUBIS

No. BP. 06931053



**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG**

2011

**Skripsi Ini Diajukan Sebagai Salah Satu Syarat untuk
Menempuh
Ujian Sarjana Farmasi pada Fakultas Farmasi Universitas
Andalas
Padang**

Disetujui oleh

Pembimbing I

Pembimbing II

Dr.rer.nat.Dian Handayani,

Dr. Netty Suharti, MS

Apt

Skripsi Ini Telah Dipertahankan pada Ujian Sarjana

Farmasi

Fakultas Farmasi

Universitas Andalas Padang

Pada tanggal : 15 Agustus 2011

No.	Nama	Jabatan	Tanda Tangan
1	Dr. Dian Handayani, Apt	Ketua	
2	Dr. Netty Suharti, MS	Sekretaris	
3	Dra. Rustini, M.Si, Apt	Anggota	
4	Prof. Dr. Dachriyanus, Apt	Anggota	
5	Dra. Rahmi Nofita R. M.Si, Apt	Anggota	

KATA PENGANTAR

Syukur Alhamdulillah penulis ucapkan kepada Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi yang berjudul **“ISOLASI DAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI NON POLAR SPON LAUT *Axinella carteri* TERHADAP BAKTERI *Ralstonia solanacearum*”**. Skripsi ini dibuat sebagai salah satu syarat untuk menempuh ujian Sarjana Farmasi pada Fakultas Farmasi Universitas Andalas, Padang.

Pada penulisan skripsi ini penulis mendapat banyak bantuan dari semua pihak, baik moril maupun materil. Penghargaan dan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya diucapkan kepada Ibu Dr. rer. nat. Dian Handayani, Apt selaku pembimbing I dan Ibu Dr. Netty Suharti, MS selaku pembimbing II dan juga pembimbing akademis Bapak Dr. H. Yohannes Alen. M,Sc, yang dengan penuh perhatian dan kesabaran telah memberikan bimbingan, nasehat, serta petunjuk selama melaksanakan penelitian dan penulisan skripsi ini.

1. Bapak dan Ibu staf pengajar Fakultas Farmasi yang telah memberikan ilmu pengetahuannya kepada penulis selama ini.
2. Bapak dan Ibu karyawan Fakultas Farmasi yang telah membantu kelancaran studi penulis.
3. Keluarga tercinta, papa, mama, kakak dan adek, yang memberikan dukungan kepada penulis untuk menyelesaikan skripsi ini.
4. Rekan-rekan kerja di Laboratorium Biota Sumatera dan Laboratorium Mikrobiologi yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian ini.
5. Keluarga besar mahasiswa farmasi terutama Phorensix yang telah memberikan bantuan, semangat dan dorongan kepada penulis hingga selesainya penelitian ini.

Semoga Allah SWT memberikan balasan atas segala kebaikan dengan pahala yang berlipat ganda. Penulis menyadari bahwa skripsi ini jauh dari kesempurnaan. Untuk itu, kritik dan saran yang membangun sangat diharapkan untuk perbaikan dan kesempurnaan skripsi ini.

Akhirnya penulis berharap agar skripsi ini dapat bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan.

Padang, 15 Agustus 2011

Penulis

ABSTRAK

Senyawa K telah diisolasi dari fraksi *n*-heksana spon laut *axinella carteri* dendi. Pemisahan senyawa dilakukan dengan metoda kromatografi dan pemurnian secara rekristalisasi. Senyawa K berupa amorf putih sebanyak 21 mg dengan jarak leleh 144-146°C. Berdasarkan analisa data reaksi kimia dengan vanillin sulfat, Lieberman Bourchard, spectrum inframerah, senyawa K diduga adalah golongan terpenoid. Hasil uji Konsentarsi Hambat Minimum, senyawa K dengan metoda difusi agar terhadap *Ralstonia solanacearum* adalah 0,25%.

ABSTRACT

The compound K has been isolated from the fraction of *n*-hexane marine sponge *Axinella Carteri* dendi. The isolation of the compound was performed by chromatography method and the purification by recrystallization. Compound K was a white amorf (21 mg) and melted at 144-146 °. Based on the analysis data of the chemical reaction with vanilin sulfat, Liebermann Bourchard, and infrared spectrum data, it could be assumed that the compound K was a terpenoid group. The result of antibacterial activities assay show that the Minimum Inhibitory Concentration of the compound K using the diffusion test method against *Ralstonia solanacearum* bacteria was 0,25%.

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR	iii
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xii
I. PENDAHULUAN	1
II. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Spon (Porifera)	4
2.1.1 Tinjauan Umum	4
2.1.2 Morfologi Spon	5
2.2 Spon Laut <i>Axinella carteri</i>	7
2.2.1 Klasifikasi	7
2.2.2 Morfologi	7
2.2.3 Kandungan Kimia dan Bioaktivitas Spon Laut	
Genus <i>Axinella</i>	8
2.3 Terpenoid	9

2.3.1	Tinjauan Umum Terpenoid	9
2.3.2	Klasifikasi Terpenoid	9
2.3.3	Sifat Fisika dan Kimia Terpenoid	15
2.3.4	Biosintesis Terpenoid	16
2.4	Ekstraksi dan Fraksinasi	18
2.4.1	Ekstraksi	18
2.4.2	Fraksinasi	19
2.5	Metoda Pemisahan	19
2.5.1	Kromatografi Lapis Tipis	20
2.5.2	Kromatografi Kolom	22
2.6	Pemurnian	23
2.7	Karakterisasi Senyawa Hasil Isolasi	23
2.7.1	Spektroskopi Inframerah	23
2.8	Bakteri	25
2.8.1	Tinjauan Umum Bakteri	25
2.8.2	Bakteri <i>Ralstonia solanacearum</i>	26
2.8.2.1	Klasifikasi	26
2.8.2.2	Morfologi	26
2.8.3	Pertumbuhan Bakteri	27
2.8.4	Mekanisme Kerja Antibakteri	29
2.8.5	Antibakteri Pembanding	31
2.8.6	Metoda Pengujian Aktivitas Antibakteri	32

III. PELAKSANAAN PENELITIAN

3.1	Waktu dan Tempat Penelitian	35
3.2	Metodologi Penelitian	35
3.2.1	Alat	35
3.2.2	Bahan	36
3.3	Prosedur Penelitian	36
3.3.1	Pengambilan Sampel	36
3.3.2	Identifikasi Sampel	36
3.3.3	Ekstraksi dan Fraksinasi	37
3.3.4	Pemeriksaan Pendahuluan	37
3.3.5	Pemeriksaan Aktivitas Antibakteri Hasil Ekstraksi dan Fraksinasi dengan Metoda Difusi Agar	38
3.3.6	Isolasi dan Pemurnian Senyawa Antibakteri	40
3.3.7	Uji Aktivitas Antibakteri Senyawa Hasil Isolasi	43
3.3.8	Karakterisasi Senyawa Antibakteri Hasil Isolasi	43

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1	Hasil	45
4.2	Pembahasan	46

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1	Kesimpulan	52
5.2	Saran	52
	DAFTAR PUSTAKA	53
	LAMPIRAN	57

DAFTAR GAMBAR

GAMBAR	Halaman
1. Struktur hymenialdisine dan debromohymenialdisine	8
2. Struktur axinastin 2 dan axinastin 3	8
3. Unit Isopren	9
4. Biosintesis Terpenoid	16
5. Kurva Fase Pertumbuhan Bakteri	29
6. Rumus Molekul Streptomisin	32
7. Gambar Spon Laut <i>Axinella carteri</i>	57
8. Skema Ekstraksi dan Fraksinasi Senyawa Antibakteri dari Spon Laut <i>Axinella carteri</i>	59
9. Gambar Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi <i>n</i> -heksan terhadap <i>Ralstonia. solanacearum</i>	61
10. Gambar Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi etilasetat terhadap <i>Ralstonia. solanacearum</i>	62
11. Skema Isolasi Senyawa Antibakteri dari fraksi <i>n</i> -heksan dari Spon Laut <i>Axinella carteri</i>	63
12. Skema Isolasi Senyawa Antibakteri dari fraksi II <i>n</i> -heksan dari Spon Laut <i>Axinella carteri</i>	64
13. Gambar Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Senyawa K terhadap <i>R. solanacearum</i>	66
14. Gambar Hasil Uji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)	

Senyawa K terhadap <i>R. solanacearum</i>	67
15. Pola KLT Senyawa K	69
16. Pemeriksaan Senyawa K dengan Pereaksi Liebermann Bourchard	70
17. Spektrum Inframerah senyawa K	71
18. Morfologi <i>R. solanacearum</i>	72
19. Gambar uji pektinase	73
20. Gambar hasil uji hipersensitif	74
21. Gambar hasil uji patogenitas	74

DAFTAR TABEL

TABEL	Halaman
I. Klasifikasi terpenoid	9
II. Hasil Uji Pendahuluan Kandungan Kimia Metabolit Sekunder dari Spon Laut <i>Axinella carteri</i>	58
III. Hasil Pengukuran Diameter Daerah Hambatan Pertumbuhan Bakteri oleh Ekstrak dan Fraksi <i>Axinela carteri</i>	60
IV. Hasil Pengukuran Aktivitas Antibakteri dari Senyawa K 65	
V. Karakterisasi Senyawa K	68
VI. Data Spektroskopi Inframerah Senyawa K	71

I. PENDAHULUAN

Indonesia adalah negara kepulauan terbesar di dunia dan mempunyai panjang pantai 81.000 km yang kaya akan terumbu karang dan biota laut lainnya. Salah satu biota laut yang saat ini banyak diteliti adalah spon. Wilayah laut Indonesia merupakan salah satu pusat penyebaran terbesar spon di dunia dan diperkirakan terdapat sekitar 830 jenis yang hidup tersebar di wilayah ini (Van Soest, 1989).

Spon merupakan salah satu komponen biota penyusun terumbu karang yang mempunyai potensi bioaktif yang belum banyak dimanfaatkan. Hewan laut ini mengandung senyawa aktif yang persentase keaktifannya lebih besar dibandingkan dengan senyawa-senyawa yang dihasilkan oleh tumbuhan darat (Muniarsih dan Rachmaniar, 1999). Spon laut diketahui menjadi tempat hidup beberapa jenis bakteri yang jumlahnya mencapai 40 % dari biomassa spon. Simbiosis yang terjadi antara bakteri dengan spon laut menyebabkan organisme ini sebagai invertebrata laut yang memiliki potensi antibakteri yang lebih besar dibandingkan dengan organisme darat dan laut lainnya (Kanagasabhapathy, *et al.*, 2005).

Mengingat begitu potensialnya spon laut ini dan masih banyak spon laut yang belum diteliti, maka perlu dilakukan penelitian terhadap kandungan senyawa kimia dan bioaktifitasnya. Salah satu spon laut tersebut adalah *Axinella carteri*.

Axinella carteri memiliki beberapa kandungan kimia yang menarik. Berdasarkan penelusuran literatur dilaporkan, diantaranya kandungan senyawa alkaloid turunan guanidin, seperti 3 bromohimentialdisin, debromohimentialdisin yang aktif sebagai insektisida terhadap hama *spodoptera lituralis* (Supriyono, 1995), beberapa senyawa peptida yaitu Axinella A dan Axinella B (Randozzo, 1998), 10-isothiocyanatoalloaromadendrane yang diisolasi dari *Axinella cannabina* (Ciminiello. P, 1987), senyawa terponoid dengan kode AC-H221 dan AC-H 32, memberikan aktivitas larvasida terhadap larva nyamuk *Culex* sp (Handayani, D, 2006) . Senyawa axinellamide dengan nama Trivial : (1) (5-hydroxy-5-((E,E)-6-methyl-2,4-octadienyl)-3-pyrrolin-2-onef), mempunyai aktivitas sebagai antineoplastik (Petit, 1993).

Berdasarkan uraian di atas, maka dilakukan penelitian isolasi dan uji aktivitas antibakteri dari fraksi nonpolar spon laut *Axinella carteri* terhadap bakteri penyebab penyakit layu

tanaman jahe, *Ralstonia solanacearum*. Penyakit layu bakteri yang disebabkan oleh *R. solanacearum*, merupakan penyakit utama yang menyerang jahe sehingga menyebabkan penurunan produksi jahe. Selain itu, *R. Solanacearum* juga menyebabkan kontaminasi lahan, sehingga tidak dapat ditanami dalam jangka waktu yang lama (Machmud,1985).

Jahe (*Zingiber officinale* Rosc.) merupakan salah satu komoditas ekspor penting dan bahan baku obat tradisional serta fitofarmaka yang banyak digunakan dalam industri obat herbal di Indonesia (Adaniya, S dan D. Shirai, 2001). Tahun 2002, produksi jahe mengalami penurunan drastis hingga 7.471 ton dengan nilai US \$ 4.029.000 (Ditjenbun, 2004). Sampai saat ini usaha pengendalian penyakit ini sudah banyak dilakukan, seperti usaha pencegahan melalui pergiliran tanaman, sanitasi lahan, penggunaan bibit sehat (Sitepu, 1991), tetapi hasilnya belum optimal. Penggunaan antibiotik Streptomisin juga telah dipergunakan secara terbatas, namun harganya mahal tidak terjangkau oleh petani (Mulya, *et al.*, 2004). Untuk itu diperlukan upaya pengendalian lain, salah satunya adalah pengendalian biologi atau hayati.

Salah satu teknik yang dikembangkan adalah pengendalian hayati menggunakan senyawa metabolit sekunder

yang terkandung di dalam organisme laut, karena senyawa-senyawa tersebut memiliki struktur kimia yang unik dan aktivitas farmokologis yang sangat menarik, antikanker, antimikroba, antiinflamasi dan lain-lain (Carte, 1996).

Metoda yang digunakan dalam penelitian ini meliputi pengambilan sampel spon laut di sekitar perairan Mandeh yang kemudian diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut metanol dan difraksinasi dengan berbagai pelarut berdasarkan tingkat kepolarannya. Pemisahan senyawa dilakukan dengan cara kromatografi kolom dan dimonitor dengan KLT. Senyawa yang didapatkan dimurnikan dengan cara rekristalisasi (Gritter, Bobbitt, and Scharwaring, 1991).

Uji aktivitas antibakteri senyawa hasil isolasi dilakukan dengan metoda difusi agar (Lay, 2001). Karakterisasi senyawa hasil isolasi dilakukan dengan pemeriksaan fisika, kimia, dan fisikokimia.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Spon (Porifera)

2.1.1 Tinjauan Umum

Spon merupakan hewan multiseluler yang termasuk ke dalam filum porifera. Kata porifera berasal dari kata latin, pori = lubang-lubang kecil, dan faro = mengandung, membawa. Kata tersebut menunjukkan kekhususan hewan yang bersangkutan, yaitu memiliki banyak lubang-lubang kecil dan bila disingkat cukup disebut hewan berpori (Jasin, 1984).

Spon memiliki ciri-ciri khusus :

1. Tubuh memiliki banyak pori yang merupakan awal dari sistem kanal (saluran air) yang menghubungkan daerah eksternal dengan daerah internal.
2. Tubuh tidak dilengkapi dengan apendiks dan bagian yang dapat digerakkan.
3. Belum memiliki sistem saluran pencernaan makanan. Pencernaan makanan berlangsung di dalam sel atau intraseluler.
4. Bentuk dan warna tubuh sangat bervariasi.

5. Hidup dengan mengikatkan diri pada suatu obyek yang keras yang dipakai sebagai tambatan.
6. Berkembang biak secara seksual maupun aseksual.
7. Respirasi dan ekskresi berlangsung secara difusi.

Spon laut memiliki potensi bioaktif yang sangat besar. Kandungan bioaktif tersebut dikelompokkan menjadi beberapa kelompok, yaitu antiinflamasi, antitumor, antivirus, antimalaria, dan antibiotik.

Penemuan senyawa yang aktif sebagai antibakteri dari spon laut diantaranya adalah senyawa kalihinol Y dan X yang diisolasi dari spon laut *Acanthella cavernosa*, merupakan golongan diterpen dan memiliki aktivitas sebagai antibakteri terhadap bakteri *Bacillus subtilis*. Melophlin C merupakan senyawa polyketida yang diisolasi dari spon laut *Melophlus Sarassinorum* memiliki aktivitas sebagai antibakteri terutama terhadap bakteri *Bacillus subtilis* dan *Staphylococcus aureus* (Mayer, *et al.*, 2007).

2.1.2 Morfologi Spon (Jasin, 1984)

Hewan porifera (spon) memiliki lubang–lubang kecil pada dinding tubuhnya. Dinding tubuh tersusun atas dua lapisan, yaitu :

1. Lapisan luar yang disebut lapisan epidermis atau ephitelium dermal.
2. Lapisan dalam yang terdiri atas jajaran sel-sel berleher yang disebut koanosit yang berbentuk botol yang memiliki flagelum.

Di antara kedua lapisan itu terdapat zat antara yang berbahan gelatin. Di dalam zat antara itu terdapat :

- a. *Amoebocyte* yang berfungsi mengedarkan zat-zat makanan ke sel lainnya dan menghasilkan gelatin.
- b. *Porocyte* (sel pori) yang terletak di sekitar pori, yang berfungsi membuka dan menutup pori dan sering disebut myocyt.
- c. *Scleroblast* yang berfungsi membentuk spikula (kerangka tubuh).
- d. *Archeocyt* merupakan sel amoebosit embrional yang tumpul dan dapat membentuk sel-sel lainnya, misalnya sel-sel reproduksi.
- e. *Spicula* yang merupakan unsur pembentuk tubuh.

Menurut Warren (1982), Ruppert dan Barnes (1991), filum Porifera terdiri dari empat kelas, yaitu

1. Calcarea.

Kelas Calcarea adalah kelas spons yang semuanya hidup di laut. Spons

ini mempunyai struktur sederhana dibandingkan yang lainnya. Spikulanya terdiri dari kalsium karbonat dalam bentuk *calcite*.

2. Demospongiae

Kelas Demospongiae adalah kelompok spons yang terdominan di antara Porifera masa kini, sering berbentuk masif dan berwarna cerah dengan sistem saluran yang rumit, dihubungkan dengan kamar-kamar bercambuk kecil yang bundar. Spikulanya ada yang terdiri dari silikat dan ada beberapa (Dictyoceratida, Dendroceratida dan Verongida) spikulanya hanya terdiri serat spongin, serat kollagen atau spikulanya tidak ada.

3. Hexactinellida

Kelas Hexactinellida merupakan spons gelas. Mereka kebanyakan hidup di laut dalam dan tersebar luas. Spikulanya terdiri dari silikat dan tidak mengandung sponging.

4. Sclerospongia.

Kelas Sclerospongia merupakan spons yang kebanyakan hidup pada perairan dalam di terumbu

karang atau pada gua-gua, celah-celah batuan bawah laut atau terowongan diterumbu karang

Semua jenis ini adalah bertipe leuconoid yang kompleks yang mempunyai spikula silikat dan serat spongin. Elemen-elemen ini dikelilingi oleh jaringan hidup yang terdapat pada rangka basal kalsium karbonat yang kokoh atau pada rongga yang ditutupi oleh kalsium karbonat

2.2 Spon Laut *Axinella carteri*

2.2.1 Klasifikasi (Van Soest, 2002)

Spon laut *Axinella carteri* diklasifikasikan sebagai :

Kingdom	: Animalia
Filum	: Porifera
Kelas	: Demospongia
Ordo	: Axinellida
Famili	: Axinellidae
Genus	: <i>Axinella</i>
Spesies	: <i>Axinella carteri</i>

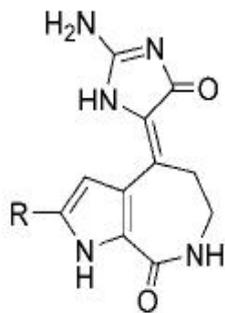
2.2.2 Morfologi

Spon laut *Axinella carteri* merupakan hewan metazoa sederhana, mempunyai bentuk tidak beraturan (asimetris) dengan massa seperti daging lembek, berwarna kuning

kecoklatan, dan pada tubuhnya terdapat banyak pori. Spon ini tumbuh melekat pada permukaan karang

2.2.3 Kandungan Kimia dan Bioaktivitas Spon Laut *Axinella carteri*

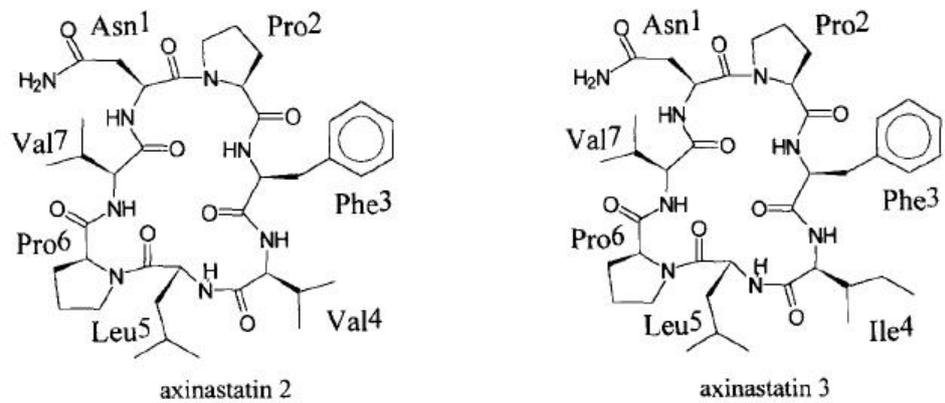
Genus *Axinella* memiliki beberapa kandungan kimia yang menarik. Dari penelusuran literatur dilaporkan, di antaranya alkaloid turunan guanidine, hymenialdisin memberikan aktivitas insektisida (Supriyono, 1995). Axinastatin 2 dan 3 sebagai agen anti kanker (R.K. Konat 1995). Hymenamide C dan isohymenamide sebagai imunomodulating (Verbist, J. F. 1998).



Gambar 1. R=Br, hymenialdisine

R=H,

debromohymenialdisine

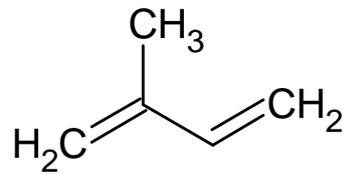


Gambar 2. Axinastatin 2 dan axinastatin 3

2.3. Terpenoid

2.3.1. Tinjauan Umum Terpenoid

Terpenoid merupakan senyawa metabolit sekunder yang dibangun oleh dua atau lebih unit atom C₅ yang disebut unit isopren (2-metil-1,3-butadiena). Unit-unit isopren tersebut saling berikatan secara teratur dalam molekul, di mana “kepala” dari unit yang satu berikatan dengan “ekor” dari unit yang lain. Keteraturan mengenai struktur terpenoid disebut kaidah isopren (Harborne, 1987).



Gambar 3. Unit Isopren (Harborne, 1987)

2.3.2 Klasifikasi Terpenoid

Berdasarkan jumlah unit isopren yang membangunnya, senyawa terpenoid dapat dibagi atas beberapa golongan yaitu : monoterpenoid, sesquiterpenoid, diterpenoid, triterpenoid, tetraterpenoid dan politerpenoid (Harborne, 1987; Mann, *et al.*, 1994).

Tabel I. Klasifikasi Terpenoid

No	Nama	Jumlah isopren	Rumus Kimia
1.	Monoterpenoid	Dua buah	$C_{10}H_{16}$
2.	Sesquiterpenoid	Tiga buah	$C_{15}H_{24}$
3.	Diterpenoid	Empat buah	$C_{20}H_{32}$
4.	Triterpenoid	Enam buah	$C_{30}H_{48}$
5.	Politerpenoid	>Delapan buah	$(C_5H_8)_n$

Terpenoid mencakup sejumlah besar senyawa yang berasal dari unit molekul yang sama. Terpenoid merupakan senyawa metabolit sekunder yang kerangka strukturnya dibangun oleh dua atau lebih unit C₅ yaitu unit isopren (2-metil-1,3-butadiena) yang menyebabkan terbentuknya keanekaragaman struktur terpenoid. Berdasarkan sejarah, nama terpen diberikan kepada hidrokarbon yang ditemukan dalam minyak terpenin (Brunetton, 1999).

Semua terpenoid diduga dibangun dari penggabungan sejumlah unit 5-karbon 2-metilbutadiena. Wallach (1887) telah memperkirakan bahwa terpenoid dibangun dari sejumlah unit isopren dan beberapa tahun kemudian Ruzicka (1953) menyatakan hipotesis tentang kaidah pembentukan terpenoid. Kaidah tersebut menyatakan bahwa tiap-tiap kelompok terpenoid berasal dari penggabungan secara kepala ke ekor berselang-seling sejumlah unit isopren. Perbedaan struktur tiap kelompok terpenoid terbukti melibatkan beberapa reaksi, seperti siklisasi, perubahan gugus fungsi, dan penataan ulang (Mann, 1994; Brunetton, 1999).

Kaidah pembentukan terpenoid dianggap umum, sehingga benar atau tidaknya suatu struktur dapat dinilai dengan memperlihatkan apakah sesuai dengan kaidah ini.

Penyimpangan kaidah ini dapat terjadi, tetapi unit-unit isopren masih dapat dikenali. Penyimpangan ini terjadi akibat hilangnya satu atau lebih ikatan kepala ke ekor, suatu bagian dari kerangka karbon tidak mempunyai sifat isoprenik dan hilang atau bertambahnya atom karbon. Penyimpangan dari aturan pembentukan dapat terjadi terutama pada triterpen dan steroida, yaitu melalui reaksi tambahan seperti pemendekkan rantai dan reaksi penata ulang, contohnya : terjadi pemindahan gugus CH_3 (Mann, 1994).

Beberapa golongan dari terpenoid :

1. Golongan Monoterpenoid (Senyawa C_{10})

Golongan monoterpenoid merupakan terpenoid yang mempunyai dua unit isopren (C_5H_8)₂. Golongan monoterpenoid biasanya muncul dalam bentuk hidrokarbon, alkohol, aldehid dan keton.

Golongan monoterpenoid dibagi atas beberapa kelompok, yaitu :

a. Monoterpenoid Asiklik

Monoterpenoid asiklik merupakan monoterpenoid yang tidak berstruktur siklik.

- Bentuk hidrokarbon, contoh : mirsen dan osimen

- Bentuk alkohol, contoh : sitronelol, geraniol, linalool dan nerol
- Bentuk aldehid, contoh : sitral
- Bentuk keton, contoh : tageton

b. Monoterpenoid Monosiklik

Monoterpenoid monosiklik merupakan monoterpenoid yang berstruktur satu siklik.

- Bentuk hidrokarbon, contoh : (-)-limonen, -felandren dan -simen
- Bentuk alkohol, contoh : -terpineol, timol dan mentol
- Bentuk keton, contoh : menton dan karvon

c. Monoterpenoid Bisiklik

Monoterpenoid bisiklik merupakan monoterpenoid yang berstruktur dua siklik.

- Bentuk hidrokarbon, contoh : -pinen, -pinen,
- 3 -karen, kamfen, dan sabinen
- Bentuk alkohol, contoh : (+)-kamfor dan borneol
- Bentuk keton, contoh : fenkon dan tujon

d. Monoterpenoid Trisiklik

Monoterpenoid trisiklik merupakan monoterpenoid yang berstruktur tiga siklik, contoh : trisiklen

e. Monoterpenoid Tetrasiklik

Monoterpenoid tetrasiklik merupakan monoterpenoid yang berstruktur empat siklik, contoh : teresantalol

Selain golongan di atas juga terdapat monoterpenoid tropolon dan lakton (iridoid) karena alur biosintesisnya, seperti nepetalakton dan loganin (senyawa antara dalam pembentukan alkaloid indol). Golongan lain yang tidak mengikuti kaidah pembentukan terpenoid secara kepala ke ekor seperti artemesia keton, -siklolavandual, karquesol dan metil heptenon.

2. Golongan Seskuiterpenoid (Senyawa C₁₅)

Golongan seskuiterpenoid merupakan terpenoid yang mempunyai tiga unit isopren (C₅H₈)₃. Seskuiterpenoid muncul dengan tipe kerangka asiklik sampai bisiklik. Golongan seskuiterpenoid dapat diklasifikasikan sebagai berikut :

a. Seskuiterpenoid Asiklik

Seskuiterpenoid asiklik merupakan seskuiterpenoid yang tidak berstruktur siklik.

❖ Bentuk alkohol, contoh : farnesol dan nerolidol

❖ Bentuk hidrokarbon, contoh : farnesan

b. Seskuiterpenoid Monosiklik

Seskuiterpenoid monosiklik merupakan seskuiterpenoid yang berstruktur satu siklik.

- ❖ Bentuk asam, contoh : asam absisat
- ❖ Bentuk hidrokarbon, contoh : -bisabolen, elemen dan zingiberen

c. Seskuiterpenoid Bisiklik

Seskuiterpenoid bisiklik merupakan seskuiterpenoid yang berstruktur dua siklik.

- ❖ Bentuk alkohol, contoh : karotol
- ❖ Bentuk hidrokarbon, contoh : eudesman, iresan, -kadinen, -muurolen, kariofelen, -selinen.

d. Seskuiterpenoid Lakton

Seskuiterpenoid lakton merupakan seskuiterpenoid yang memiliki gugus lakton, contoh : santonin dan xantinin.

3. Golongan Diterpenoid (Senyawa C_{20})

Golongan diterpenoid merupakan senyawa terpenoid yang memiliki empat unit isopren $(C_5H_8)_4$. Diterpenoid mempunyai kerangka karbon C_{20} dari unit isopren. Golongan diterpenoid dapat ditemukan dalam bentuk struktur asiklik sampai pentasiklik. Berdasarkan hal tersebut, maka diterpenoid dapat diklasifikasikan sebagai berikut :

a. Diterpenoid Asiklik

Diterpenoid asiklik merupakan diterpenoid yang tidak berstruktur siklik, contoh : fitol.

b. Diterpenoid Bisiklik

Diterpenoid bisiklik merupakan diterpenoid yang mempunyai struktur dua siklik, contoh : -enamanool dan *cis*-abienol.

c. Diterpenoid Trisiklik

Diterpenoid trisiklik merupakan diterpenoid yang mempunyai struktur tiga siklik, contoh : asam abietat, asam agalat, pimarol dan pimaral.

d. Diterpenoid Tetrasiklik

Diterpenoid tetrasiklik merupakan diterpenoid yang mempunyai struktur empat siklik, contoh : grayanatoksin.

e. Diterpenoid Pentasiklik

Diterpenoid pentasiklik merupakan diterpenoid yang mempunyai struktur lima siklik, contoh : cembrena.

4. Golongan Triterpenoid (Senyawa C₃₀)

Triterpenoid merupakan golongan senyawa terbesar dalam kelas terpenoid yang dibentuk oleh kerangka karbon, terdiri

dari 6 unit isopren dan dalam biosintesis diturunkan dari hidrokarbon C_{30} asiklik yaitu skualen yang merupakan senyawa antara bagi pembentukan senyawa cycloartenol pada tumbuhan dan senyawa lanosterol pada hewan dan jamur. Senyawa ini tidak berwarna, berbentuk kristal, sering bertitik leleh tinggi dan aktif optik pada umumnya sukar dicirikan karena tak ada kereaktifan kimianya. Triterpen dapat dibagi dalam empat golongan senyawa : triterpen sebenarnya, steroid, saiconon, dan glikosida jantung.

5. Golongan Politerpenoid

Golongan politerpenoid yang mempunyai lebih dari 8 unit isopren $(C_5H_8)_n$. Diketahui lebih dari 2000 spesies tumbuhan memproduksi politerpenoid. Politerpenoid berupa alkohol-alkohol primer asiklik yang disebut poliprenol dan terdapat dalam tumbuhan tingkat tinggi, terutama dalam daun. Contoh : karet, solanesol dan dolikol.

2.3.3 Sifat Fisika dan Kimia Terpenoid (Miller, 1973)

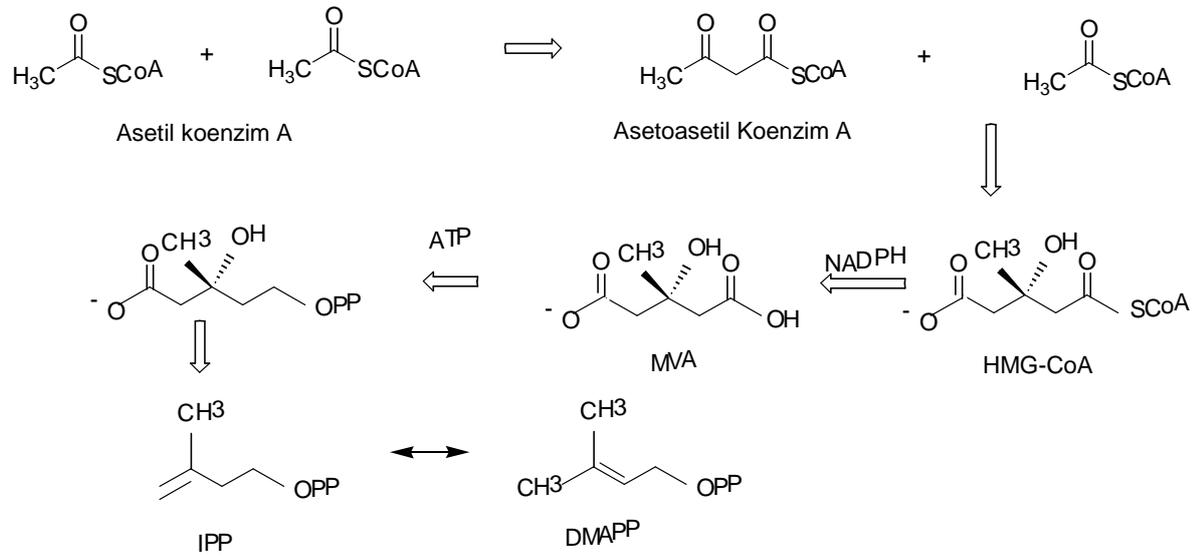
Terpenoid umumnya dapat larut dalam lipid dan mempunyai sifat yang mudah menguap. Golongan monoterpenoid berwujud cair dengan titik didih antara 140-180°C, sedangkan golongan seskuiterpenoid juga berwujud cair

dengan titik didih yang lebih besar yaitu 200°C. Golongan diterpenoid mempunyai sifat yang sukar menguap, sedangkan triterpenoid tidak menguap. Golongan triterpenoid berbentuk padat berupa kristal dengan titik leleh tinggi dan bersifat optis aktif.

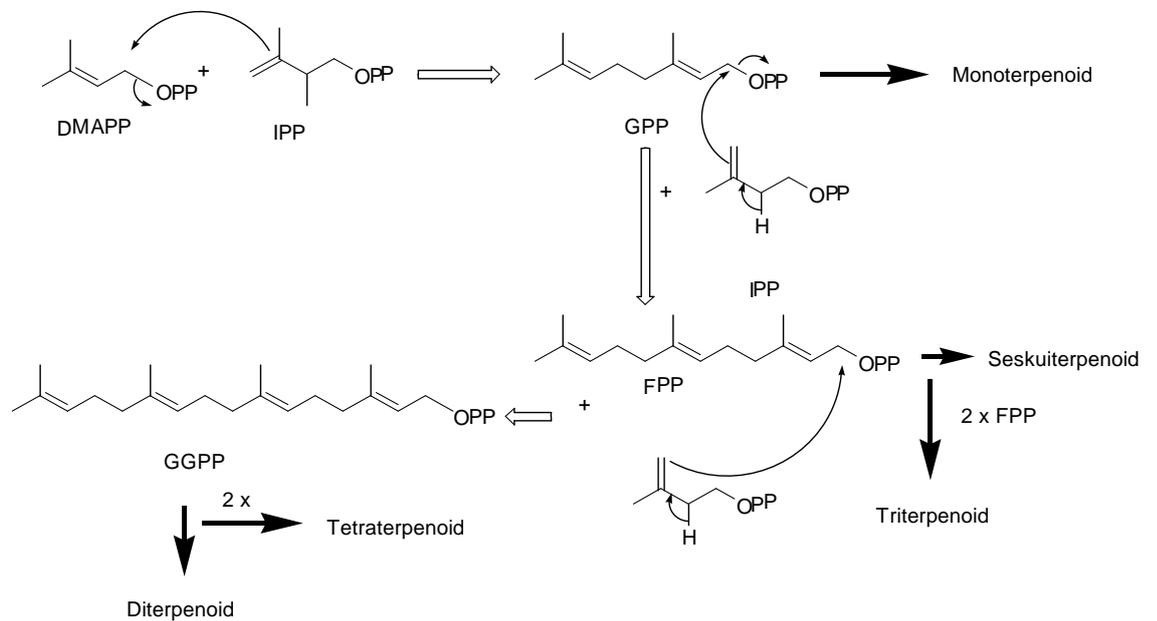
Pada golongan tetraterpenoid karotenoid mempunyai sifat yang mudah larut di dalam lipid dan lebih banyak terhidrolisis, membentuk ikatan rangkap dengan gugus alkena, asetilena atau diperpanjang oleh satuan isopren tumbuhan menghasilkan karotenoid baru (C_{45}/C_{50}). Pigmen karotenoid bersifat tidak stabil karena mudah teroksidasi di udara

2.3.4 Biosintesis Terpenoid

Proses biosintesa terpenoid adalah sebagai berikut :



Pada tahap awal dengan dikatalisis oleh enzim Asetoasetil-ScoA Tiolase terjadi reaksi kondensasi ester Claisen antara 2 molekul Asetil ScoA. Pada tahap kedua dengan katalis enzim Hidroksimetilglutaril-ScoA (HMG-ScoA) sintase melalui reaksi aldol dihasilkan Asam Mevalonat (MVA). Reaksi-reaksi berikutnya adalah fosforilasi, eliminasi asam fosfat, dan dekarboksilasi menghasilkan Isopentenil pirofosfat (IPP) yang selanjutnya berisomerasi menjadi Dimetilalil pirofosfat (DMAPP) (Mann, 1994).



Gambar 4. Biosintesa Terpenoid (Mann, 1994)

IPP sebagai unit isopren aktif bergabung menurut kaidah isopren yaitu melalui kepala-ekor dengan DMAPP yang merupakan langkah pertama dari polimerisasi isopren untuk menghasilkan terpenoid. Penggabungan terjadi karena serangan elektron dari ikatan rangkap IPP terhadap atom C pada DMAPP yang kekurangan elektron, diikuti pelepasan ion pirofosfat sehingga menghasilkan geranyl pirofosfat (GPP) yaitu senyawa antara bagi senyawa monoterpenoid (Mann, 1994).

Penggabungan selanjutnya IPP dengan GPP dengan cara yang sama menghasilkan farnesil pirofosfat (FPP) yang

merupakan senyawa antara bagi senyawa seskuiterpenoid. Senyawa diterpenoid berasal dari penggabungan FPP dengan IPP dan senyawa tetraterpenoid berasal dari penggabungan 2 molekul diterpenoid (Mann, 1994).

2.4 Ekstraksi dan Fraksinasi (Fisher, 1992; Harborne, 1987)

2.4.1 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan suatu proses penarikan senyawa-senyawa kimia dari tumbuh-tumbuhan, hewan, dan lain-lain menggunakan pelarut tertentu. Teknik yang umum untuk ekstraksi senyawa kimia adalah dengan cara maserasi, sokletasi, perkolasi dan perebusan.

Maserasi merupakan proses penyarian sederhana yaitu dengan merendam sampel dalam pelarut yang sesuai beberapa kali selama 3-5 hari. Pelarut akan menembus ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif, zat aktif akan larut dan karena perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel dengan di luar sel maka larutan yang terpekat akan didesak keluar. Peristiwa tersebut terjadi berulang-ulang sampai terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di dalam sel dan di luar

sel. Keuntungan dari metoda maserasi yaitu teknik pengerjaan dan alat yang digunakan sederhana serta dapat digunakan untuk mengekstraksi senyawa yang bersifat termolabil.

Sokletasi merupakan teknik penyarian dengan pelarut organik menggunakan alat soklet. Pada cara ini pelarut dan sampel ditempatkan secara terpisah. Prinsip kerjanya adalah penyarian yang dilakukan berulang-ulang sehingga penyarian lebih sempurna dan pelarut yang digunakan relatif sedikit. Akan tetapi, metoda sokletasi ini tidak dapat digunakan untuk mengekstraksi senyawa yang termolabil.

Perkolasi merupakan teknik penyarian dengan pelarut organik menggunakan alat perkolator. Pada cara ini pelarut dialirkan melewati sampel sehingga penyarian lebih sempurna. Namun metoda ini membutuhkan pelarut yang relatif banyak.

Perebusan merupakan teknik penyarian menggunakan pelarut air. Pada cara ini sampel direndam dengan pelarut kemudian dipanaskan sampai mendidih. Metoda perebusan merupakan metoda yang paling kuno dan sekarang jarang digunakan karena proses penyarian kurang sempurna dan tidak dapat digunakan untuk mengekstraksi senyawa yang termolabil.

2.4.2 Fraksinasi

Fraksinasi pada prinsipnya merupakan teknik pemisahan ekstrak berdasarkan tingkat kepolarannya. Senyawa bersifat polar akan tertarik ke pelarut polar, senyawa bersifat semi polar akan tertarik ke pelarut semi polar dan senyawa bersifat non polar akan tertarik ke pelarut non polar. Pelarut yang umum dipakai untuk fraksinasi adalah *n*-heksana, etil asetat, dan *n*-butanol. Untuk menarik lemak dan senyawa non polar digunakan *n*-heksana, etil asetat untuk menarik senyawa semi polar, sedangkan butanol untuk menarik senyawa-senyawa polar. Tiap-tiap fraksi diuapkan secara *in vacuo* sampai kental dengan *rotary evaporator*.

2.5 Metoda Pemisahan

Kromatografi

Kromatografi adalah suatu teknik yang diterapkan untuk memisahkan komponen-komponen dalam campuran yang cukup rumit. Semua metoda kromatografi didasarkan atas pembagian zat yang harus dipisahkan kepada dua jenis fasa. Fasa yang pertama disebut fasa stasioner, karena dengan atau tanpa bantuan suatu medium (zat pendukung) yang padat. Fasa yang

kedua disebut fasa gerak, karena bergerak melalui fasa yang pertama (Djamal, 1990).

Pemisahan pada kromatografi berdasarkan perbedaan distribusi komponen pada fasa diam, fasa gerak dan berdasarkan kepada sifat-sifat molekul. Sifat utama yang terlibat adalah kecenderungan molekul untuk melarut dalam cairan (kelarutan), kecenderungan molekul untuk melekat pada permukaan serbuk halus (adsorpsi) dan kecenderungan molekul untuk menguap (keatsirian). Pada sistem kromatografi, campuran yang akan dipisahkan ditempatkan dalam keadaan tertentu sehingga komponen-komponen harus menunjukkan dua dari ketiga sifat tersebut (Scheuer, 1987; Ikan, 1991).

2.5.1 Kromatografi Lapis Tipis (Suganda, 1997)

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) adalah suatu metoda pemisahan berdasarkan sifat kimia dan fisika dari zat. Suatu campuran dapat dipisahkan dari persenyawaan kimia atau fisika ke dalam komponen-komponen murni yang membentuk senyawa tersebut, dengan menggunakan zat penyerap berupa serbuk halus yang dilapiskan serba rata pada lempeng kaca.

Penggunaan KLT secara umum adalah untuk tujuan :

1. Kualitatif

Yaitu didasarkan pada harga Rf yang didefinisikan sebagai perbandingan jarak rambat yang dicapai oleh senyawa dengan fase gerak.

Harga Rf tidak selalu pasti sama, oleh karena itu harga Rf digunakan sebagai :

- a. Petunjuk jarak migrasi relatif.
- b. Orientasi pemilihan fase gerak untuk kromatografi kolom.
- c. Monitoring hasil pemisahan kromatografi kolom.

2. Kuantitatif

Yaitu penetapan visual dari ukuran bercak dibanding senyawa pembanding (ketepatan rendah) atau dengan metode spektrofotodensitometri atau dilakukan dengan pengerokan, pengelusian dan metode spektroskopi. Pemakaian kuantitatif untuk menunjukkan banyaknya masing-masing komponen campuran relatif terhadap komponen lain atau mutlak jika digunakan baku pembanding dan kalibrasi yang sesuai.

3. Preparatif

Tujuan preparatif yaitu untuk memperoleh suatu senyawa dalam keadaan murni dari bentuk komponen

campuran dalam jumlah yang memadai atau untuk kebutuhan lain.

Fasa diam pada KLT mempunyai beberapa penyerap yang dapat digunakan, di antaranya yaitu

a. Silika Gel

Bersifat agak sedikit asam maka sedikit mudah dipisahkan dengan meminimalkan reaksi asam-basa antara penyerap dan senyawa yang dipisahkan.

b. Alumina

Bersifat sedikit basa dan sering digunakan untuk memisahkan basa dengan meminimumkan reaksi asam-basa.

c. Kieselguhr dan selulosa

Merupakan bahan penyangga lapisan zat cair yang dipakai dalam Kromatografi Cair Cair (KCC), digunakan untuk memisahkan senyawa polar seperti asam amino, karbohidrat, nukleotida dan berbagai senyawa hidrofil lainnya.

2.5.2 Kromatografi Kolom

Kromatografi kolom adalah suatu teknik pemisahan yang berdasarkan daya adsorpsi dari suatu adsorben, baik terhadap

hasil isolasi maupun terhadap pengotornya. Prinsip kromatografi kolom adalah perbedaan daya serap masing-masing komponen.

Metoda kromatografi kolom diperkenalkan oleh Michael Tswett seorang ahli botani dari Rusia. Pada kromatografi kolom terlebih dahulu dilakukan kromatografi lapis tipis untuk menentukan adsorben yang cocok dan pelarut yang sesuai agar memberikan hasil yang baik. Adsorben yang paling umum digunakan adalah silika gel, alumina, dan sephadex.

Ada dua metoda penggunaan fasa gerak pada kromatografi kolom. Pertama metoda SGP (*Step Gradien Polarity*) di mana fasa gerak yang digunakan dimulai dari pelarut non polar kemudian kepolaran pelarut ditingkatkan secara bertahap, baik dengan pelarut tunggal atau kombinasi dua pelarut yang berbeda kepolarannya dengan perbandingan tertentu sesuai dengan tingkat kepolaran yang dibutuhkan. Sedangkan yang kedua adalah metoda isokratik, di mana fasa gerak yang digunakan tetap, baik berupa pelarut tunggal maupun campuran pelarut yang berbeda kepolarannya dengan kombinasi yang sesuai. Metoda isokratik digunakan apabila komponen-komponen kimia dalam suatu fraksi dapat memisah dengan baik yang diketahui dari pola noda pada kromatografi lapis tipis.

2.6 Pemurnian (Harborne, 1987)

Senyawa hasil isolasi jarang didapatkan berupa senyawa murni, biasanya dicemari oleh senyawa lain selama isolasi. Salah satu pemurniannya adalah dengan rekristalisasi yaitu berdasarkan perbedaan kelarutan antara zat utama yang akan dimurnikan dengan senyawa minor dalam suatu pelarut tunggal atau campuran pelarut yang cocok.

Pelarut yang digunakan dipilih berdasarkan kemampuan melarutkan zat yang akan dimurnikan dengan baik, dapat memisahkan pengotor, dapat memisahkan kristal murni serta tidak bereaksi secara kimia dengan zat yang akan dimurnikan. Adanya perbedaan kelarutan akibat pemanasan atau penambahan pelarut lain yang akan menyebabkan senyawa utama akan mengkristal terlebih dahulu. Proses rekristalisasi ini diulang beberapa kali sehingga didapatkan senyawa berbentuk kristal yang murni dan ditandai dengan jarak leleh yang tajam.

2.7.1 Karakterisasi Senyawa Hasil Isolasi

2.7.2 Spektroskopi Inframerah (Sastroadmijojo, 1991; Dachriyanus, 2004)

Spektroskopi inframerah dapat digunakan untuk menentukan gugus fungsi yang terdapat pada senyawa organik, tapi penggunaannya dalam penentuan senyawa organik masih terbatas. Setiap frekuensi sinar (termasuk inframerah) mempunyai energi tertentu, apabila frekuensi tertentu diserap ketika melewati sebuah senyawa yang sedang diselidiki, maka energi dari frekuensi tersebut ditransfer ke senyawa tersebut. Energi pada radiasi inframerah sebanding dengan energi yang timbul pada getaran-getaran ikatan. Pada ikatan kovalen, atom-atom tidak disatukan oleh ikatan yang kaku, kedua atom berikatan karena kedua inti atom tersebut terikat pada pasangan elektron yang sama. Kedua inti atom tersebut dapat bergetar maju-mundur dan depan-belakang, atau menjauhi masing-masing, dalam posisi yang memungkinkan.

Energi yang terlibat pada getaran ini tergantung pada jarak ikatan tersebut dan massa kedua atom. Ini berarti bahwa setiap jenis ikatan akan bergetar dengan cara yang berbeda pula, yang melibatkan energi dengan jumlah yang berbeda-beda pula.

Ikatan-ikatan selalu bergetar, tapi jika energi dilewatkan dengan jumlah yang tepat sama dengan yang dimiliki ikatan tersebut, getaran-getaran itu bisa pindah ke tingkat yang lebih tinggi. Jumlah energi yang diperlukan untuk melakukan ini

tergantung pada ikatan masing-masing, karenanya setiap ikatan-ikatan yang berbeda, akan menyerap frekuensi (energi) inframerah yang berbeda-beda pula.

Tidak hanya bergerak, ikatan-ikatan juga dapat berbelok, jadi dapat disimpulkan, bahwa pergerakan ikatan dan pembelokan ikatan menghasilkan lembah yang berbeda dalam spektrum tersebut.

Ada 2 macam vibrasi yang utama dalam molekul:

1. Vibrasi ulur (*stretching*)

Berkaitan dengan jarak antara 2 atom dalam molekul sepanjang sumbu ikatan.

2. Vibrasi tekuk (*bending*)

Menyangkut perubahan sudut antara 2 ikatan atau gugus terhadap sisa molekul. Ada 4 tipe vibrasi tekuk, yaitu:

- Goyangan (*rocking*)
- Pelintiran (*waging*)
- Guntingan (*scissoring*)
- Kibasan (*twisting*)

2.8 Bakteri

Bakteri uji merupakan bakteri yang digunakan dalam pengujian aktivitas antibakteri. Pemilihan bakteri uji tergantung dari tujuan pengujian.

2.8.1 Tinjauan Umum Bakteri (Volk & Wheeler, 1993)

Bakteri merupakan organisme prokariotik bersel tunggal dan ada beberapa di antaranya yang bersel banyak membentuk seperti gumpalan. Bakteri termasuk organisme primitif penyebab utama penyakit pada manusia. Bakteri dapat dibedakan dengan cara identifikasi berdasarkan morfologi, koloni (ukuran, bentuk, warna) morfologi mikroskopik (tipe flagel, ada tidaknya kapsul, atau endospora, sifat pewarnaan, kebutuhan biokimia, dan pembiakannya).

Berdasarkan pewarnaan bakteri, bakteri dapat dibagi atas:

a. Bakteri gram positif

Dinding sel bakteri gram positif cukup tebal 20-80 nm, terdiri dari 60-100% peptidoglikan. Beberapa organisme gram positif mengandung substansi dinding sel yang disebut asam teikoat. Fungsi dari asam teikoat belum diketahui dengan pasti, namun mutan yang kehilangan kemampuan untuk membuat asam teikoat akan cacat dalam pemisahan sel, contoh : *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*.

b. Bakteri gram negatif

Dinding sel bakteri gram negatif mempunyai susunan kimia yang lebih rumit daripada bakteri gram positif. Dinding sel bakteri gram negatif mengandung peptidoglikan yang lebih sedikit, tetapi di luar lapisan peptidoglikan ada struktur "membrane" kedua yang tersusun atas protein *fosfolipida* dan lipopolisakarida. Contoh : *Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa*.

2.8.2 Bakteri *Ralstonia solanacearum*

2.8.2.1 Klasifikasi (Ramdan, 2010)

Bakteri *Ralstonia solanacearum* diklasifikasikan sebagai

:

Kingdom	: Bakteri
Filum	: Proteobacteria
Kelas	: Schizomycetes
Ordo	: Eubacteriales
Famili	: Pseudomonadaceae
Genus	: <i>Ralstonia</i>
Spesies	: <i>Ralstonia solanacearum</i>

2.8.2.2 Morfologi

Ralstonia solanacearum adalah bakteri aerobik, berbentuk batang, berukuran (0,5 – 1,0 x 1,5 – 2,5) µm, gram negatif, tumbuh pada suhu 4-41 °C, dan bergerak dengan satu flagel yang terletak di ujung. Pada medium TTC, koloni *R. solanacearum* yang virulen akan membentuk koloni yang luas, tidak beraturan, cembung, berlendir, dan warna putih susu dengan tengahnya berwarna merah muda, sedangkan yang tidak virulen tidak atau kurang berwarna merah (Ramdan, 2010).

Ras-ras *R. solanacearum* dapat dibedakan berdasarkan jenis tanaman inang yang diinfeksi, yaitu ras 1 menyerang tanaman dari famili *Solanaceae*, *Leguminosae*, dan *Cucurbitaceae*, ras 2 menyerang pisang, ras 3 menyerang kentang dan tomat, ras 4 menyerang jahe, dan ras 5 menyerang tanaman murbai (Habazar & Rivai, 2004).

2.8.3 Pertumbuhan Bakteri

1. Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan Bakteri

Pertumbuhan bakteri uji merupakan pertambahan ukuran dari sel bakteri yang pada mulanya berukuran kecil menjadi berukuran sebesar sel induknya. Pertumbuhan ini berlangsung

cepat dengan adanya faktor-faktor luar yang menguntungkan seperti (Volk & Wheeler, 1993) :

a. Nutrisi

Kebutuhan nutrisi bakteri meliputi bahan makanan umum seperti air, karbohidrat sebagai sumber karbon, protein sebagai sumber nitrogen dan ion-ion organik

b. Suhu

Bakteri uji dapat tumbuh baik pada suhu optimum. Untuk bakteri uji digunakan suhu optimum 35-37^oC. Berdasarkan suhu optimum yang diperlukan bakteri digolongkan atas :

- Psikofilik : bakteri yang dapat hidup pada suhu 10 – 20^oC

- Mesofilik : bakteri yang hidup pada suhu 20 – 40^oC

- Termofilik :
bakteri yang hidup pada suhu lebih tinggi dari 50-60^oC

c. pH medium

Sebagian besar spesies bakteri tumbuh pada pH 6,8 - 7,2.

d. Oksigen

Berdasarkan kebutuhan oksigen, bakteri dibedakan atas bakteri aerob yang tumbuh dengan adanya oksigen dan bakteri anaerob yang dapat tumbuh tanpa oksigen. Ada juga bakteri anaerob fakultatif yaitu bakteri dapat tumbuh dengan atau tanpa adanya oksigen.

e. Zat kimia

Zat kimia yang hanya menghambat pertumbuhan bakteri tanpa membunuhnya disebut bakteriostatik, sedangkan zat kimia yang dapat membunuh bakteri disebut bakterisid.

2. Fase Pertumbuhan Bakteri

Fase pertumbuhan bakteri dapat diproyeksikan sebagai logaritma jumlah sel terhadap waktu pertumbuhan, dibagi 4 fase, yaitu :

a. Fase penyesuaian (*Lag Phase*)

Merupakan fase penyesuaian pada lingkungan (adaptasi) dan lamanya tergantung pada macam bakteri, umur biakan, dan nutrien yang terdapat dalam medium. Dalam fase ini bakteri belum mengadakan pembelahan.

b. Fase pertumbuhan (*Logarhythmic / Exponential Phase*)

Pada fase ini pembiakan bakteri berlangsung cepat, sel-sel mulai membelah dan jumlahnya meningkat secara logaritma sesuai dengan pertambahan waktu. Pada beberapa bakteri pada fase ini biasanya menghasilkan senyawa metabolit primer seperti karbohidrat dan protein.

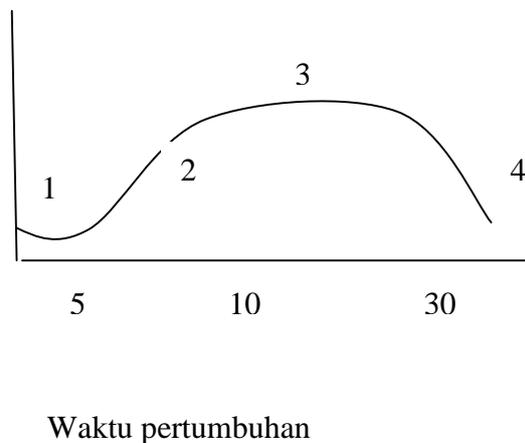
c. Fase Stasioner (*Stationary Phase*)

Pada fase ini terjadi suatu keadaan seimbang antara jumlah bakteri yang berkembang biak dengan jumlah bakteri

yang mati, sehingga jumlah keseluruhan bakteri adalah tetap. Pada beberapa bakteri, fase ini biasanya menghasilkan senyawa metabolit sekunder seperti antibiotika dan polimer.

d. Fase Kematian (*Period of Decline*)

Pada fase ini jumlah bakteri yang mati makin banyak, ini disebabkan \log jumlah sel kin berkurangnya jumlah makanan dalam medium, sel . pembiakan berhenti dan keadaan lingkungan yang sanga k diakibatkan oleh semakin banyak hasil metabolit yang tidak berguna dan mengganggu pertumbuhan bakteri.



Gambar 5. Kurva fase pertumbuhan bakteri (Volk and Wheeler, 1993)

Keterangan:

- | | |
|-------------------------------|-------------------|
| 1. Fase lag
(eksponensial) | 2. Fase log |
| 3. Fase stasioner | 4. Fase kematian. |

2.8.4 Mekanisme Kerja Antibakteri

Antibakteri menghambat pertumbuhan atau membunuh bakteri dengan bermacam cara yaitu (Volk and Wheeler, 1993):

1. Menghambat sintesa dinding sel bakteri.

Dinding sel bakteri mengandung zat yang secara kimia merupakan suatu polimer kompleks suatu mukopeptida (peptidoglikan) terdiri dari polisakarida dan polipeptida. Suatu obat antibakteri bila berikatan dengan reseptor selnya dapat mengakibatkan kerusakan pada dinding sel bakteri atau menghambat reaksi pembentukan dinding sel. Kerusakan pada dinding sel atau hambatan pembentukannya dapat berakibat lisis pada sel sehingga sel bakteri akan mati.

2. Menghambat sintesa protein sel bakteri.

Protein merupakan suatu senyawa yang sangat penting pada bakteri, dua pertiga dari berat kering bakteri terdiri dari protein. Sel bakteri dalam kehidupannya perlu mensintesis

protein. Sintesis protein berlangsung di ribosom dengan bantuan m-RNA dan t-RNA. Ribosom bakteri terdiri atas dua sub unit yang dinyatakan sebagai ribosom 30S dan 50S. Untuk berfungsi pada sintesa protein, kedua komponen ini akan bersatu pada pangkal rantai m-RNA menjadi ribosom 70S.

Penghambatan sintesis protein dapat terjadi dengan cara mencegah masuknya asam amino baru ke dalam rantai peptida yang baru. Pengamatan sintesis ini dapat juga dikarenakan pesan m-RNA salah dibaca pada daerah pengenalan ribosom, akibatnya asam amino yang dimasukkan ke dalam peptida ini menghasilkan protein yang tidak fungsional.

3. Mempengaruhi membran sel bakteri

Membran sel adalah struktur yang semipermeabel yang merupakan tempat jalannya metabolit ke dalam dan ke luar sel. Kerusakan membran sel menyebabkan keluarnya berbagai komponen penting dari dalam sel bakteri seperti protein, asam nukleat dan nukleotida yang mengakibatkan kematian sel.

4. Menghambat biosintesa asam nukleat

Pada umumnya antibakteri menghambat sintesa asam nukleat dengan cara berikatan dengan benang halus ganda DNA. Kompleks DNA dengan antibakteri yang terbentuk menghambat

RNA polimerasi yang terlibat dalam biosintesa DNA atau RNA dan menghambat pembentukan m-RNA. Penghambatan sintesis ini dapat juga dengan cara berikatan dengan RNA polimerase sehingga menghambat sintesa bakteri.

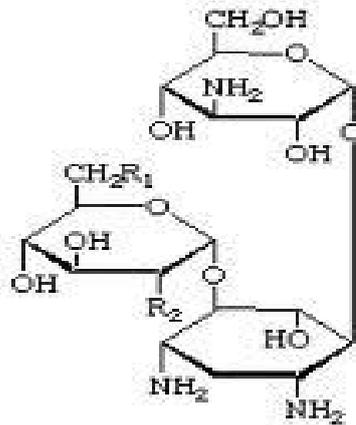
2.8.5 Antibakteri Pembanding

Dalam pengujian aktivitas antibakteri biasanya digunakan antibakteri pembanding yang telah diketahui aktivitasnya. Tujuannya untuk mengetahui kepekaan bakteri uji yang digunakan.

Streptomisin

Streptomisin merupakan antibiotik golongan aminoglikosida yang dihasilkan oleh *Streptomyces griseus*. Obat ini dalam perdagangan berada dalam bentuk garam sulfat. Streptomisin sulfat merupakan serbuk hygroskopis berwarna putih yang tidak berbau dan memiliki rasa agak pahit. Sangat mudah larut dalam air dan praktis tidak larut dalam etanol (Depkes RI, 1979).

Rumus molekul dari Streptomisin adalah sebagai berikut:



Gambar 6. Rumus Molekul Streptomisin (Windiasari, 2009)

Streptomisin bekerja dengan cara menghambat sintesa protein dari bakteri melalui ikatan dengan sub unit ribosomal 30S yang menyebabkan kesalahan urutan peptida dalam membentuk rantai protein.

Golongan aminoglikosida umumnya bersifat bakterisid dan bekerja dengan spektrum luas. Efek samping aminoglikosida secara umum adalah ototoksisitas permanen (gangguan keseimbangan dan pendengaran) (Windiasari, 2009).

2.8.6 Metoda Pengujian Aktivitas Antibakteri

Aktivitas antibakteri suatu sampel dapat dideteksi dengan mengamati respon pertumbuhan berbagai jenis bakteri yang berkontak dengan sampel tersebut. Hal ini memungkinkan dilakukan suatu uji aktivitas antibakteri yang terdapat dalam sampel tersebut.

Metoda pengujian aktivitas antibakteri dibedakan atas 3 cara, yaitu: (Volk & Wheeler, 1993; Berghe & Vlietinck, 1991).

a. Metoda Difusi

Metoda difusi merupakan metoda yang sederhana dalam pengujian aktivitas antibakteri. Pada metoda ini pencadang (reservoir) yang mengandung sampel uji ditempatkan pada permukaan medium yang telah diinokulasi dengan bakteri uji. Setelah inkubasi, diameter daerah bening sekitar pencadang diukur. Prinsip metoda difusi yaitu pengukuran luas daerah hambatan pertumbuhan bakteri karena berdifusinya sampel dari titik awal pemberian ke daerah difusi.

b. Metoda Dilusi

Metoda dilusi merupakan metoda yang paling sederhana dibandingkan metoda pengujian aktivitas antibakteri lainnya.

Sampel uji dicampur dengan medium cair yang telah diinokulasikan dengan bakteri uji. Prinsip metoda ini adalah sampel diencerkan hingga diperoleh beberapa macam konsentrasi, lalu masing-masing konsentrasi ditambah suspensi bakteri dalam media. Setelah inkubasi, diamati ada tidaknya pertumbuhan bakteri dengan melihat kekeruhan dari masing-masing konsentrasi sampel yang dibandingkan dengan kontrol. Konsentrasi sampel terendah yang menghambat pertumbuhan bakteri ditunjukkan dengan tidak adanya kekeruhan, disebut dengan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) atau Minimum Inhibitory Concentration (MIC).

c. Metoda Bioautografi

Bioautografi adalah metoda untuk mengetahui lokasi aktivitas antibakteri pada kromatogram. Metoda ini berdasarkan pada metoda difusi, di mana sampel akan berdifusi dari kromatogram ke medium yang telah diinokulasi dengan bakteri uji dan daerah hambat terlihat tepat pada bercak kromatogram. Metoda ini sangat membutuhkan perlengkapan mikrobiologi yang kompleks, masalah perbedaan difusi senyawa dari kromatogram ke medium agar, konsentrasi bercak pada kromatogram yang tidak terukur dan mudahnya kontaminasi

oleh mikroba udara, membuat metoda ini agak rumit dalam pengerjaannya. Plat Kromatografi Lapis Tipis (KLT) disemprot dengan suspensi bakteri, kemudian diinkubasi selama beberapa hari. Daerah hambatan divisualisasikan dengan penampak noda, seperti garam tetrazolium (Betina, 1973).

III. PELAKSANAAN PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan selama \pm 8 bulan dari bulan september sampai april 2011 di Laboratorium Biota Sumatra dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Farmasi Universitas Andalas Padang.

3.2. Metodologi Penelitian

3.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan untuk pengerjaan isolasi adalah : seperangkat alat destilasi, penangas air, desikator, peralatan *rotary evaporator*, lemari pengering (oven), bejana kromatografi lapis tipis (*chamber*), kolom kromatografi, botol semprot, erlenmeyer dan gelas ukur, plat tetes, pipet tetes, corong pisah, corong, vial, lampu UV 254 nm, spatel, botol maserasi, botol infus, timbangan analitik, Spektrofotometer IR, Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu®) dan *Fisher Jhon Melting Point Apparatus*.

Alat-alat yang digunakan pada pengujian aktivitas antibakteri : pinset, pipet mikro, cawan petri, jarum ose, kertas

cakram Schleicher & Schuell®, kapas, kain kassa, lampu spiritus, autoklaf All American®, *incubator* (Galenkamp plus®), lemari aseptis, erlenmeyer, tabung reaksi, *Laminar Air Flow* (LAF) *Cabinet* ESCO®, Vorteks FisonsWhirlimixer™, magnetik stirrer.

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan untuk isolasi meliputi : spon laut *Stylissa carteri*, metanol, air suling, *n*-heksana, etil asetat, kapas, silika gel 60, plat KLT silika gel 60 F 254, CHCl₃, H₂SO₄ 2N, pereaksi Dragendorf, pereaksi Mayer, amoniak, vanillin asam sulfat, FeCl₃, pereaksi Liebermann-Burchard.

Bahan-bahan yang digunakan pada pengujian aktivitas antibakteri : Nutrient agar (NA) (Merck®), air suling steril, Dimetilsulfoksida (DMSO), Streptomisin sulfat, dan bakteri uji *Ralstonia solanacearum* (diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Pertanian, UNAND).

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Pengambilan Sampel

Sampel diambil pada tanggal 18 juli 2010, di sekitar perairan Mandeh pada kedalaman \pm 15 m, Kecamatan Koto XI Tarusan Kanagarian Ampang Pulau, Kabupaten Pesisir Selatan, Sumatera Barat.

3.3.2 Identifikasi Sampel

Sampel spon laut diidentifikasi di museum Zoologi Amsterdam Belanda oleh Dr. Nicole J.de. Voogd, sampel spon laut dengan nomor ZNATOR.10924 *Axinella carteri*. Sampel disimpan di Laboratorium Biota Sumatera Fakultas Farmasi Universitas Andalas, Padang, Sumatera Barat.

3.3.3 Ekstraksi dan Fraksinasi (Harborne, 1987 ; Fisher & Williamson, 1992)

Sampel segar spon laut *Axinella carteri* dirajang halus dan ditimbang sebanyak 1 kg, kemudian dimaserasi dengan metanol sebanyak 3 x 1500 ml selama tiga hari sambil sesekali dikocok. Setelah tiga hari disaring dan maserasi dilanjutkan

sampai tiga kali. Maserat yang didapatkan digabung dan pelarutnya diuapkan secara *in vacuo*, sehingga didapatkan ekstrak kental metanol.

Fraksinasi dilakukan di dalam corong pisah dengan menggunakan pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda. Fraksinasi diawali dengan penambahan air suling sebanyak 200 ml ke dalam ekstrak kental metanol dan ditambahkan pelarut non polar (*n*-heksana) sebanyak 6 x 150 ml, dan dikocok, kemudian didiamkan sampai terbentuk dua lapisan, lapisan atas merupakan fraksi heksan dan lapisan bawah merupakan fraksi air. Fraksi heksan diambil dan diuapkan secara *in vacuo* sehingga didapatkan fraksi kental *n*-heksan sebanyak 6 gram. Fraksinasi dilanjutkan dengan pelarut etil asetat yang bersifat semi polar sebanyak 7 x 150 ml. Proses yang sama diulangi seperti pada pengerjaan fraksi *n*-heksana, sehingga diperoleh fraksi etil asetat dan fraksi air. Hasil fraksi etil asetat digabung kemudian diuapkan secara *in vacuo* sehingga diperoleh fraksi kental etil asetat.

3.3.4 Pemeriksaan Pendahuluan (Harborne, 1987; Simes, *et al.*, 1995)

Pemeriksaan pendahuluan meliputi pemeriksaan fitokimia untuk menguji kandungan alkaloid, fenolik, saponin, steroid dan terpenoid. Pemeriksaan terhadap metabolit sekunder ini dilakukan terhadap ekstrak kental metanol, lalu ditambahkan air suling dan CHCl_3 sama banyak masing-masing 10 ml lalu dikocok kuat dan biarkan sampai terbentuk 2 lapisan, kemudian dipisahkan. Lapisan air digunakan untuk pemeriksaan senyawa fenolik dan saponin. Pemeriksaan senyawa fenolik dilakukan dengan cara menambahkan besi (III) klorida (FeCl_3), hasil tes dikatakan positif apabila terbentuk warna hijau sampai biru. Pemeriksaan senyawa saponin dilakukan dengan cara mengocok lapisan air di dalam tabung reaksi, hasil tes dikatakan positif apabila terbentuk busa yang bertahan selama lebih kurang 15 menit.

Lapisan CHCl_3 digunakan untuk menguji senyawa terpenoid dan steroid. Pemeriksaan senyawa terpenoid dan steroid dilakukan dengan cara menyaring lapisan CHCl_3 dengan kapas dan norit kemudian biarkan mengering pada plat tetes. Setelah mengering tambahkan asam asetat anhidrat dan H_2SO_4 pekat, hasil positif untuk terpenoid apabila terbentuk warna

merah dan hasil positif untuk steroid apabila terbentuk warna biru.

Pemeriksaan senyawa alkaloid dilakukan dengan cara ekstrak kental metanol ditambahkan 10 ml air suling, kemudian ditambahkan 10 ml kloroform-amoniak 0,05 N, dikocok perlahan dan biarkan sampai terjadi pemisahan, kemudian ditambahkan 0,5 ml H₂SO₄ 2 N, dikocok perlahan dan biarkan terjadi pemisahan. Lapisan asam diambil dan dimasukkan ke tabung reaksi lain kemudian ditambahkan pereaksi Mayer atau pereaksi Dragendorf. Hasil dikatakan positif apabila terbentuk endapan putih dengan pereaksi Mayer atau warna jingga dengan pereaksi Dragendorf.

3.3.5 Pemeriksaan Aktivitas Antibakteri Hasil Ekstraksi dan Fraksinasi dengan Metoda Difusi Agar

A. Sterilisasi Alat dan Bahan (Volk & Wheeler, 1993)

Alat-alat yang digunakan terlebih dahulu dicuci bersih dan dikeringkan. Vial, pipet, gelas ukur, tabung reaksi dan erlenmeyer ditutup mulutnya dengan kapas dan kain kasa, kemudian dibungkus dengan kertas aluminium foil. Kertas cakram dimasukkan ke dalam salah satu cawan petri dan semua cawan petri dibungkus secara terpisah dengan kertas aluminium

foil. Kemudian semua alat disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121 °C tekanan 15 lbs selama 15 menit. Pinset dan jarum ose disterilkan dengan cara flambier pada lampu spiritus. Laminar Air Flow (LAF) Cabinet disterilkan dengan cara menyalakan lampu UV-nya selama 5 menit.

B. Pembuatan Media Pembenihan (Atlas & Parks, 1993)

Sebanyak 20 g serbuk Nutrient Agar dilarutkan dengan 1 liter air suling dalam Erlenmeyer dan dipanaskan diatas *hotplate* menggunakan magnetik stirrer sampai terbentuk larutan jernih. Kemudian disterilkan di dalam autoklaf pada suhu 121 °C dengan tekanan 15 lbs selama 15 menit.

C. Peremajaan Bakteri Uji

Bakteri uji dari stok kultur murni ditanam pada agar miring NA, lalu diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 35°C.

D. Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Koloni bakteri uji diambil dari agar miring 1-2 ose, lalu disuspensikan dalam NaCl fisiologis steril dalam tabung reaksi steril. Kemudian dihomogenkan dengan vorteks. Kekeruhan

diukur dengan spektrofotometer UV-Vis sehingga diperoleh suspensi dengan transmitan 25% pada 580 nm.

E. Pembuatan Sampel Uji

Ekstrak kental metanol spon laut dibuat dalam berbagai konsentrasi yaitu 5%, 3% dan 1% dengan menggunakan DMSO.

F. Pengujian Aktivitas Antibakteri dengan Metoda Difusi Agar (Ely, *et al.*, 2004; Lay, 2001)

Sebanyak 0,1 ml suspensi bakteri dipipet dengan pipet mikro dan dimasukkan ke dalam cawan petri steril. Kemudian ditambahkan media NA dalam kondisi cair (± 50 °C) sebanyak 15 ml, lalu dihomogenkan dengan cara cawan petri digoyang sampai media dan bakteri tercampur homogen, kemudian dibiarkan memadat. Selanjutnya kertas cakram steril ditetesi dengan 10 μ l larutan uji, kemudian diletakkan di atas permukaan medium. Semua cawan petri diinkubasi pada suhu 35°C selama 18-24 jam. Diameter hambat yang terbentuk diukur dengan menggunakan jangka sorong. Sebagai pembanding digunakan kertas cakram steril yang ditetesi DMSO sebanyak 10 μ l dan larutan Streptomisin sulfat 1% sebanyak 10 μ l sebagai kontrol positif.

3.3.6 Isolasi dan Pemurnian Senyawa Antibakteri (Gritter, *et al.*,1991; Fisher & Williamson, 1992)

Berdasarkan pemeriksaan pendahuluan aktivitas antibakteri terhadap ekstrak metanol, fraksi *n*-heksan, dan fraksi etil asetat menunjukkan bahwa fraksi etilasetat yang paling aktif sebagai antibakteri terhadap bakteri *R. solanacearum*. Isolasi selanjutnya diutamakan terhadap fraksi yang aktif terhadap bakteri. Isolasi dilakukan pada fraksi etilasetat dengan menggunakan metoda kromatografi. Isolasi fraksi etilasetat menghasilkan 1 senyawa yang diberi nama senyawa R, tetapi tersebut kurang murni dan memiliki jumlah yang sedikit(1,5 mg), sehingga tidak dilanjutkan karakterisasi dan uji aktivitasnya.

Isolasi selanjutnya dilakukan pada fraksi *n*-heksan sebanyak 4 gram. Pemisahan dilakukan dengan kolom kromatografi menggunakan fasa diam silika gel 60 ukuran 40 – 63 μm , ditimbang sebanyak 80 gram, disuspensikan dengan *n*-Heksan, kemudian dimasukkan ke dalam kolom kaca. Sampel dibuat menjadi serbuk preabsorpsi dengan menambahkan silika gel sama banyak dengan berat sampel 10 gram ke dalam sampel yang dilarutkan dengan metanol, kemudian pelarutnya diuapkan secara *in vacuo* sehingga diperoleh campuran silika gel dan sampel

berupa serbuk kering. Sampel ditaburkan merata di atas fase diam di dalam kolom kemudian dielusi dengan komposisi eluen sebagai berikut :

<i>n</i> -Heksan : Etil asetat	9 : 1	150
ml		
<i>n</i> -Heksan : Etil asetat	4 : 1	200
ml		
<i>n</i> -Heksan : Etil asetat	3 : 2	200
ml		
<i>n</i> -Heksan : Etil asetat	1 : 1	225
ml		
<i>n</i> -Heksan : Etil asetat	2 : 3	150
ml		
<i>n</i> -Heksan : Etil asetat	1 : 4	300
ml		
Etil asetat 100 %		300
ml		
Etil asetat : Metanol	9 : 1	150
ml		
Etil asetat : Metanol	4 : 1	200
ml		

Etil asetat : Metanol	3 : 2	300
ml		
Etil asetat : Metanol	1 : 1	200
ml		
Etil asetat : Metanol	2 : 3	150
ml		
Etil asetat : Metanol	1 : 4	150
ml		
Etil asetat : Metanol	1 : 9	200
ml		
Metanol 100 %		250
ml		

Fraksi yang keluar ditampung dalam vial \pm 10 ml, dimonitor dengan Kromatografi Lapis Tipis, noda diamati dibawah lampu UV pada 254 nm dan disemprot dengan penampak noda Vanilin-sulfat, fraksi dengan Rf yang sama digabung. Hasil kromatografi kolom ini diperoleh fraksi I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX dan X (lampiran 6, gambar 11).

Fraksi III (597 mg) dipisahkan dengan kromatografi kolom dengan fasa diam silika sebanyak 10 gram dan fasa gerak *n*-heksan : etil asetat (1:9 ; 8:2 ; 2:3 ; 1:1 ; 2:3 ; 1:4). Fraksi yang keluar ditampung dengan vial dan tiap fraksi

dimonitor dengan KLT, penampak noda lampu UV pada 254 nm dan penampak noda Vanilin-sulfat, fraksi dengan noda yang sama digabung, hingga diperoleh fraksi IIIa, IIIb, IIIc, III d dan IIIe. Hasil monitor KLT fraksi IIIc memberikan satu noda. Senyawa yang diperoleh dimurnikan dengan cara rekristalisasi dengan pelarut *n*-heksan- metanol, sehingga diperoleh senyawa murni dengan kode senyawa K sebanyak 6 mg (lampiran 6, gambar 11).

Fraksi II (313 mg) dikromatografi kolom dengan fasa diam silika sebanyak 10 gram dan fasa gerak *n*-heksan : etil asetat (9:1 ; 8:2 ; 3:2 ; 1:1 ; 2:3 ; 1:4). Fraksi yang keluar ditampung dengan vial dan tiap fraksi dimonitor dengan KLT, penampak noda lampu UV pada 254 nm dan penampak noda Vanilin-sulfat, fraksi dengan noda yang sama digabung, hingga diperoleh fraksi IIa, IIb, IIc, dan IId. Hasil monitor KLT fraksi IId memberikan satu noda. Senyawa yang diperoleh dimurnikan dengan cara rekristalisasi dengan pelarut *n*-heksan metanol, sehingga diperoleh senyawa murni dengan kode senyawa K sebanyak 15 mg (lampiran 6, gambar 12).

3.3.7 Uji Aktivitas Antibakteri Senyawa Hasil Isolasi dengan Metoda Difusi Agar

Senyawa hasil isolasi dilarutkan dalam DMSO dibuat dalam berbagai konsentrasi yaitu 1 %, 0,5 %, 0,25 %, 0,1 % dan 0,05 %. Konsentrasi yang digunakan ditentukan berdasarkan hasil pemeriksaan pendahuluan aktivitas antibakteri terhadap hasil fraksinasi. Untuk uji Konsentrasi Hambat Minimum, karena daerah bening hanya terbentuk sampai konsentrasi 0,25% maka dilakukan pengenceran 0,125% dan 0,1%, Kemudian masing-masing larutan sampel dengan berbagai konsentrasi ini diuji aktivitasnya terhadap bakteri uji dengan 3 kali pengulangan.

Pada inokulum bakteri uji yang telah memadat diletakkan kertas cakram steril yang ditetesi 10 µl larutan uji. Semua cawan petri diinkubasi pada suhu 35°C selama 18-24 jam. Diameter hambat diukur dengan menggunakan jangka sorong. Sebagai pembanding digunakan kertas cakram steril yang ditetesi DMSO sebanyak 10 µl dan larutan Streptomisin sulfat 1 %.

3.3.8 Karakterisasi Senyawa Antibakteri Hasil Isolasi

Karakterisasi senyawa antibakteri hasil isolasi meliputi pemeriksaan organoleptis, sifat fisika, sifat kimia, sifat fisiko kimia, dan pemeriksaan KLT.

1. Pemeriksaan Organoleptis

Meliputi pemeriksaan bau, bentuk, dan warna dari senyawa hasil isolasi.

2. Pemeriksaan fisika

Menentukan sifat fisika dari senyawa hasil isolasi.

3. Pemeriksaan kimia

Dilakukan dengan mereaksikan senyawa hasil isolasi dengan pereaksi Liebermann Bouchard, H_2SO_4 10%/MeOH, dan vanilin asam sulfat untuk menentukan golongan terpenoid dan steroid, larutan $FeCl_3$ untuk golongan fenol dan serbuk Mg/HCl pekat untuk golongan flavonoid.

4. KLT

Pemeriksaan kromatografi senyawa aktif dilakukan dengan kromatografi lapis tipis dengan eluen *n*-heksan : etil asetat (7:3), pola noda dilihat di bawah lampu UV 254 nm.

5. Pemeriksaan fisikokimia dengan spektrofotometer
Inframerah

Spektrum IR diukur dengan menggunakan alat *Infrared Spectrofotometer Perkin Elmer Spectrum One*. Kira-kira 1 mg sampel digerus homogen dengan 100 mg kalium bromida. Campuran dikempa dengan kekuatan 10 ton/cm, sehingga terbentuk sebuah pelet yang tipis dan transparan, kemudian diukur serapannya

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil

1. Pemeriksaan pendahuluan kandungan kimia spon laut *Axinela carteri* menunjukkan adanya terpenoid (lampiran 2, tabel II).
2. Dari 1 kg sampel segar spon laut *Axinela carteri* diperoleh ekstrak kental metanol 12 gram, fraksi n-heksana sebanyak 6 gram dan fraksi etil asetat 3.9 gram (lampiran 3, gambar 8).
3. Pemeriksaan pendahuluan aktivitas antibakteri terhadap ekstrak metanol, fraksi *n*-heksana dan fraksi etil asetat dilakukan dengan metoda difusi agar pada konsentrasi 1% berturut-turut adalah 10 mm, 9 mm, 8 mm (lampiran 4, tabel III, gambar 9 dan 10).
4. Hasil uji aktivitas antibakteri senyawa K terhadap bakteri *Ralstonia solanacearum*, memberikan aktivitas antibakteri pada konsentrasi 1% dengan diameter hambat 9 mm. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) untuk senyawa K adalah 0,25% (lampiran 7, tabel IV, gambar 13 dan 14).
5. Dari fraksi heksan didapatkan senyawa K dengan karakterisasi sebagai berikut:

- a. Berupa amorf putih tidak berbau yang terkomposisi pada suhu 144-146° C sebanyak 21 mg, dengan eluen *n*-heksan : etil asetat (7 : 3) diperoleh Rf 0,49 (lampiran 10, tabel V, gambar 15).
- b. Sangat mudah larut dalam 0.6 bagian heksan, mudah larut dalam 5 bagian etil asetat, larut dalam 30 bagian metanol ((lampiran 10, tabel V).
- c. Senyawa K memberikan hasil positif terhadap Liebermann Bouchard dengan warna ungu, dengan pereaksi vanillin sulfat memberikan warna ungu (lampiran 12, gambar 16).
- d. Pemeriksaan spektrum inframerah menunjukkan bahwa senyawa K memiliki serapan yang kuat pada daerah bilangan gelombang (cm⁻¹) : 3448 cm⁻¹ (vibrasi regang OH), 2939 cm⁻¹ (regang CH alifatik), 1637 cm⁻¹ (ikatan ganda C=C), 1406 cm⁻¹ (lentur C-H), 1257 cm⁻¹ (lentur C-H), 1108 cm⁻¹ (lentur C-H), 801 cm⁻¹ (lentur C-H) (lampiran 13, tabel IV, gambar 17).

4.2 Pembahasan

Spon laut *Axinella carteri* diambil di sekitar perairan Mandeh Kabupaten Pesisir Selatan, Sumatera Barat. Spon laut

terlebih dahulu dicuci dengan air, kemudian ditiriskan. Kandungan kimia spon laut *Axinella carteri* diekstraksi dengan cara maserasi, dimana sebelumnya dilakukan perajangan sampel. Tujuan perajangan sampel untuk memperluas permukaan sampel, sehingga saat direndam dengan metanol maka luas permukaan kontak antara pelarut dengan sampel menjadi lebih besar dan akan mempermudah proses pelarutan senyawa-senyawa yang terkandung di dalam jaringan sampel.

Metoda maserasi dipilih karena pengerjaannya lebih sederhana dan alat yang digunakan sedikit. Maserasi dilakukan dengan cara merendam sampel dalam pelarut organik selama 3 x 3 hari, sambil sesekali dikocok, sehingga membantu percepatan difusi zat dari sampel ke dalam pelarut. Proses penyarian ini dilakukan di tempat yang terlindung dari cahaya untuk mencegah kerusakan senyawa yang kurang stabil terhadap cahaya.

Maserasi dilakukan dengan pelarut metanol karena dapat melarutkan hampir semua senyawa organik yang ada pada sampel, baik senyawa polar maupun senyawa nonpolar. Selain itu metanol memiliki titik didih yang relatif rendah yaitu 67 °C, sehingga mudah diuapkan dan mengurangi resiko terurainya zat yang terkandung di dalam maserat saat penguapan pelarut. Maserat metanol yang diperoleh diuapkan dengan menggunakan destilasi

vakum. Proses ini akan menguapkan pelarut lebih cepat karena tekanan uap pelarut menjadi turun dan mendidih pada temperatur yang lebih rendah dari titik didihnya sehingga dapat mengurangi resiko kerusakan senyawa termolabil yang terkandung pada sampel.

Fraksinasi dilakukan di dalam corong pisah dengan menggunakan pelarut berdasarkan tingkat kepolaran. Fraksinasi dimulai dari pelarut non polar *n*-heksan dilanjutkan dengan etilasetat yang bersifat semipolar. Hasil fraksinasi dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator*. Penggunaan *rotary evaporator* akan memperluas daerah penguapan karena adanya sumber panas yang membantu proses penguapan. Proses penguapan pelarut dipercepat dengan dikurangnya tekanan udara yang menyebabkan penurunan tekanan uap pelarut sehingga pelarut akan mendidih pada temperatur yang lebih rendah dari titik didihnya. Hasil fraksinasi yang diuapkan menghasilkan masa kental, kemudian ditimbang dan didapatkan berat masing-masing fraksi.

Fraksi dimurnikan dengan menggunakan kromatografi kolom dengan silika gel sebagai fasa diam. Sistem elusi yang digunakan pada metoda ini adalah sistem elusi dengan kepolaran bertingkat (SGP/ Step Gradien Polarity) yang dimulai dari pelarut

non polar (*n*-heksan) hingga pelarut polar (MeOH). Isolasi fraksi etilasetat menghasilkan 1 senyawa yang diberi nama senyawa R, tetapi yang didapatkan kurang murni dan memiliki jumlah yang sedikit, sehingga tidak dilanjutkan karakterisasi dan uji aktivitasnya.

Isolasi dilanjutkan terhadap fraksi *n*-heksan dan didapatkan senyawa K. Sistem elusi yang digunakan pada metoda pemisahan ini adalah sistem elusi dengan kepolaran bertingkat (SGP /Step Gradien Polarity) yang dimulai dari pelarut non polar (*n*-heksan) hingga pelarut polar (MeOH). Senyawa K didapatkan dari subfraksi III dan subfraksi II. Pemurnian dilakukan dengan cara rekristalisasi menggunakan campuran pelarut *n*-heksan metanol. Proses rekristalisasi menggunakan dua pelarut berdasarkan pada perbedaan kelarutan senyawa di dalam kedua pelarut tersebut, pelarut yang melarutkan senyawa K yaitu *n*-heksan dan pelarut yang sedikit melarutkan senyawa K yaitu metanol. Setelah murni, senyawa K diuji aktivitas antibakterinya.

Metoda yang digunakan untuk pengujian aktivitas antibakteri terhadap senyawa K adalah metoda difusi agar, karena metoda ini relatif sederhana, waktu pengerjaan singkat dan memberikan hasil yang cukup teliti. Semakin luas daerah

bening di sekeliling cakram menunjukkan semakin besar aktivitas antibakteri senyawa uji (Volk & Wheeler, 1993; Berghe & Vlietinck, 1991). Senyawa uji ditimbang dan dilarutkan dalam dimetil sulfoksida (DMSO) sehingga diperoleh konsentrasi tertentu. DMSO digunakan sebagai pelarut karena bersifat inert dan mampu melarutkan senyawa dengan berbagai tingkat kepolaran.

Uji aktivitas dilakukan terhadap bakteri *R. Solanacearum*. Bakteri ini merupakan bakteri aerobik, berbentuk batang, berukuran (0,5 – 1,0 x 1,5 – 2,5) μm , gram negatif, tumbuh pada suhu 4-41 °C, dan bergerak dengan satu flagel yang terletak di ujung. Pada medium TTC, koloni *R. solanacearum* yang virulen akan membentuk koloni yang luas, tidak beraturan, cembung, berlendir, dan warna putih susu dengan tengahnya berwarna merah muda, sedangkan yang tidak virulen tidak atau kurang berwarna merah (Ramdan, 2010)(lampiran 14).

Hasil uji aktivitas antibakteri ditunjukkan dengan terbentuknya daerah bening di sekitar cakram karena senyawa uji berdifusi di sekitar cakram, daerah bening yang diberikan senyawa uji menandakan bahwa tidak ada mikroba yang tumbuh pada daerah tersebut. Pengukuran diameter hambat berawal dari tepi daerah daya hambat sampai ke tepi daya hambat yang terpanjang lainnya. Hasil uji aktivitas fraksi kental metanol

terhadap bakteri *R. Solanacearum*, memberikan hambatan sebesar 13 mm, 12 mm dan 10 mm pada konsentrasi 5%, 3%, dan 1%, pada fraksi *n*-heksan memberikan hambatan sebesar 11 mm, 10 mm dan 9 mm pada konsentrasi 5%, 3%, dan 1%, pada fraksi etilasetat memberikan hambatan sebesar 18 mm, 13 mm dan 10 mm pada konsentrasi 5%, 3%, dan 1% (lampiran 4, tabel III). Aktivitas antibakteri ekstrak metanol lebih kecil dibandingkan dengan fraksi etilasetat disebabkan banyaknya senyawa kimia yang masih terkandung di dalam ekstrak metanol, sehingga perlu dilakukan pemisahan fraksi yang mengandung senyawa yang lebih sederhana. Aktivitas antibakteri yang kuat didapatkan dari fraksi etilasetat jika dibandingkan dengan fraksi *n*-heksan dan fraksi metanol, hal ini menandakan bahwa senyawa kimia yang potensial sebagai antibakteri terkonsentrasi pada fraksi ini. Penurunan konsentrasi tidak proporsional terhadap penurunan aktivitas antibakteri, hal ini diduga disebabkan karena aktivitasnya yang sangat kecil pada konsentrasi yang kecil atau adanya kesalahan pada saat pipetasi sampel uji. Pada fraksi *n*-heksan hanya sedikit mengandung senyawa yang berfungsi sebagai antibakteri, ini ditandai dengan diameter hambat yang diberikan sangat kecil.

Akan tetapi, isolasi dari fraksi etilasetat tidak didapatkan senyawa murni sehingga isolasi dilanjutkan ke fraksi *n*-heksan.

Hasil uji aktivitas senyawa K terhadap bakteri *R. solanacearum* memperlihatkan aktivitas antibakteri yang lemah dengan memberikan diameter hambat 9 mm pada konsentrasi 1%. Hasil ini menunjukkan bahwa tidak ada peningkatan aktivitas antibakteri dari fraksi heksan dengan senyawa K. Hal ini diduga disebabkan oleh senyawa K bersifat lipofil, sehingga tidak dapat berdifusi sempurna ke dalam media agar yang bersifat hidrofil sehingga hambatan yang dihasilkan kecil. Hasil pengujian Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) senyawa K didapatkan Konsentrasi Hambat Minimum sebesar 0,25% (lampiran 7, tabel IV, gambar 14).

Karakterisasi terhadap senyawa K meliputi sifat fisika, kimia dan fisikokimia. Pemeriksaan organoleptis terhadap senyawa meliputi bentuk, warna dan bau. Senyawa K berupa amorf tidak berwarna, tidak berbau. Pemeriksaan kelarutan dilakukan dengan cara melarutkan senyawa dalam berbagai pelarut. Senyawa K sangat mudah larut dalam *n*-heksan dimana 1 bagian senyawa K larut dalam 0,6 bagian *n*-heksan, mudah larut dalam 5 bagian etilasetat, dan larut dalam 30 bagian metanol. Pemeriksaan sifat fisika senyawa hasil isolasi

dilakukan dengan pemeriksaan jarak leleh dengan menggunakan alat *Fisher-John Melting Point Apparatus*. Pada pemeriksaan titik leleh, senyawa K suhu terkomposisi pada suhu 144-146°C. Hasil pemeriksaan reaksi kimia dengan pereaksi spesifik untuk golongan terpenoid yaitu, vanilin-sulfat memberikan warna merah muda-ungu, pereaksi Lieberman Bouchard memberikan warna ungu, dan pereaksi asam sulfat 10% memberikan warna merah muda, hasil tersebut menunjukkan bahwa senyawa K merupakan golongan terpenoid. Hasil tersebut dibandingkan dengan triterpenoid, Asiatikosida menunjukkan hasil reaksi yang sama. Profil KLT yang didapat dengan menggunakan eluen n-heksan: etil asetat(7:3) dengan penampak noda vanillin-sulfat memberikan satu noda dengan Rf 0,49(lampiran 10, tabel V, gambar 15-16).

Karakterisasi senyawa hasil isolasi dilakukan dengan spektrofotometer UV dan Inframerah (IR). Pemeriksaan dengan spektrofotometer UV tidak menghasilkan spektrum dan data spektroskopi ultraviolet, karena senyawa K tidak terlihat di bawah lampu UV. Pemeriksaan spektrum inframerah bertujuan untuk mengetahui gugus fungsi suatu senyawa organik dengan membandingkan daerah sidik jarinya (Sastroamidjojo, 1991). Pemeriksaan spektrum inframerah senyawa K memiliki pita

serapan yang jelas pada bilangan gelombang 3448 cm^{-1} yang diduga berasal dari regang OH, serapan 2939 cm^{-1} yang diduga berasal dari regang C-H alifatik, serapan pada bilangan gelombang 1637 cm^{-1} diduga berasal dari regang C=C, serapan pada bilangan gelombang 1406 cm^{-1} diduga berasal dari lentur C-H, 1257 cm^{-1} (lentur C-H), serapan pada bilangan gelombang 1108 cm^{-1} diduga berasal dari lentur C-H, dan serapan pada bilangan gelombang 801 cm^{-1} diduga berasal dari lentur C-H (Noerdin, D., 1986)(lampiran 13, tabel VI, gambar 17).

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Dari fraksi *n*-heksana didapatkan senyawa K berbentuk amorf putih sebanyak 21 mg yang terurai pada suhu 144-146° C.
2. Dari pemeriksaan kimia dengan Liebermen Bouchard dan Vanilin sulfat, diduga senyawa yang diisolasi adalah golongan terpenoid.
3. Senyawa K yang diisolasi dari *Axinella carteri* memiliki Konsentrasi Hambat Minimum 0,25% terhadap bakteri *R. solanacarum*

5.2 Saran

Disarankan kepada peneliti selanjutnya untuk melakukan elusidasi struktur dari senyawa K serta melakukan isolasi senyawa aktif dari fraksi etilasetat dan fraksi butanol.

DAFTAR PUSTAKA

Adaniya, S and D. Shirai. (2001). *In vitro induction of tetraploid ginger (Zingiber officinale Roscoe) and its pollen fertility and germination ability*. Sci. Hort. 88: 277-287.

Atlas, M. R. and L. C. Parks. (1993). *Hand book of microbiological media*. London: CRC Press.

Berghe, D.A. & Vlietinck, A.J. (1991). Screening Methods for Antibacterial and Antiviral Agents from Higher Plants. *A Method in Plant Biochemistry*, 47-48.

Betina, V. (1973). Bioautography in paper and thin layer chromatography and its scope in the antibiotic field. *J. Chromatography*, 31-34.

Brunetton, J. 1999. *Pharmacognosy* (2nd Ed). Translated by : Caroline K. H. Hampshire: Intercept Ltd.

Carte, K.B. (1996). *Biomedical potential of marine natural product*. America Institute Of Biology Science, 271-272.

Ciminiello, P. et all (1987). *Can. J. Chem.*, 65, 518-522.

Dachriyanus. (2004). *Analisis struktur senyawa organik secara spektroskopi*. Padang: Andalas University Press.

Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1979). *Farmakope Indonesia*. Jakarta: Depkes RI.

Djamal, R. (1990). *Prinsip-prinsip dasar bekerja dalam bidang kimia bahan alam*. Padang: Universitas Andalas Press

Ditjenbun. (2004). *Statistik Perkebunan Indonesia*. Jakarta: Direktorat Jenderal Bina Produksi Perkebunan, Departemen Pertanian.

Ely, R., T. Supriya, and C. G, Naik. (2004). Antimicrobial activity of marine organisms collected off the coast of south east India. *Elsevier Sciences*, 309, 121-127.

Fisher, L. F. and K. L. Williamson. (1992). *Organic Experiment* (7th ed). Lexington, Massachusetts, Toronto: D.C. Health and Company.

Habazar, T., & Rivai, F. (2004). *Bakteri patogenik tumbuhan*. Padang: Andalas University Press.

Gritter, R. J., J. M. Bobbitt, and A. E. Scharwaring. (1991). *Introduction to chromatography (pengantar kromatografi)*. (Edisi II). Penerjemah: Kokasih Padmawinata. Bandung: Penerbit ITB.

Handayani, D., Almahdy A, Ali F. (2006). Isolasi Senyawa Larvasida dari Fraksi Nonpolar Spon laut *Axinella carteri* Dendy. *Jurnal Sains Teknologi Farmasi*, 11(2).

Harborne, J.B. (1987). *Metode Fitokimia*.(Penerjemah K.Padmawinata dan I. Soediro. Penyunting S.Niksolihin). Bandung: Penerbit ITB.

Ikan, R. (1991). *Natural product, a laboratory guide*. (2nd Ed). San Diego, California: Academic Press inc.

Jasin, M. (1984). *Zoologi invertebrata untuk perguruan tinggi*. Surabaya: Sinar Wijaya.

Kanagasabhapathy, M., Sasaki, H., Nakajima, K., Nagatan, K., & Nagata, S. (2005). Inhibitory activities of surface associated bacteria from the marine sponge *Pseudoceratina purpurea*. *Microbes and Enviroment*, 20, 178-185.

Lay, B. W. (2001). *Analisis mikroba di laboratorim*. Jakarta: Raja Grafindo Persada.

Mahmud, M. (1985). *Pengamatan Penyakit Pustul dan Hawar Bakteri Kedelai*. Dalam Prosiding Kongres Nasional dan Seminar Ilmiah VIII PFI di Surabaya, hal. 35-37.

Mann, J. (1994). *Chemical aspect of biosynthesis* (1st Ed). Oxford, New York: Oxford University Press.

Miller, L.P. (1973). *Phytochemistry* (Vol. II). Van Strand Reinhold Company, New York, Cincinnati, Toronto, London, Melbourne.

Mayer, M.S.A., Rodriguez A.D., Berlinck, R.G.S., & Hamann, M.T. (2007). Marine pharmacology : Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalaria, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities, affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanism of action. *Elsevier Sciences*, 145, 553-581.

Mulya, K., Supriadi., Esther, M., Adhi., Rahayu, S., Karyan, N. (2004). Potensi bakteri antagonis dalam menekan perkembangan penyakit layu bakteri. *Jurnal Penelitian Tanaman Industri*. Bogor.

Muniarsih T, dan Rachmaniar R. (1999). Isolasi Substansi Bioaktif Antimikroba dari Spons Asal Pulau Pari Kepulauan Seribu. *Prosiding Seminar Bioteknologi Kelautan Indonesia I '98. Jakarta 14 – 15 Oktober 1998: 151- 158*. Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia Jakarta.

Noerdin, D. (1986). *Elusidasi Struktur Senyawa Organik dengan Cara Spektroskopi Ultralembayung dan Inframerah*. (Edisi 1). Bandung: Angkasa Bandung.

Pettit, G. R.; Gao, F.; Cerny, R. (1993). *Heterocycles*. 35, 711.

R.K. Konat, B. Math~i, J. Winkler, H. Kessler.(1995). *LiebigsAnn. Chem.*, 765-774.

Ramdan. (2010). *Layu Bakteri*. Diakses 4 Maret 2010 dari <http://WordPress.com>

Randozzo, F. Dalpiaz, S. Orru, C. Debitus, C. Roussakis, P. Pucci. (1998). *Axinella A and axinella B new proline-containing antifropilative cyclopeptides from Vanuatu sponge axinella carteri*. *J. Org. Cheme*, 2569-2574.

Ruppert EE, and Barnes RD. (1991). *Invertebrates Zoology*. Sixth Edition. Saunders College Publishing. Philadelphia, New York, Chicago, San Fransisco, Montreal, Toronto, London, Sidney, Tokyo. hlm 68 – 91.

Sastroamidjojo, H. (1991). *Dasar-dasar spektroskopi* (Edisi II). Yogyakarta: Liberti, Universitas Gadjah Mada.

Scheuer, J.P. (1987). *Marine natural products (produk alami lautan dari segi kimia dan biologi)*. Penerjemah: Koensoemardiyah. New York: Academic Press

Simes, J. J. H., J. G. Tracey, L. J. Webb, and W. J. Dunstan. (1995). *An australian phytochemical survey*, Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Australia, Melbourne, *Bulletin*, 281. 5-9.

Supriyono, B.Schwarz, V. Wray, L. Witte, W.E.G. Muller, R. Van soest, W. Suamryono and P. Proksch. (1995). *Bioctive alkaloid from tropical marine sponge axinella carteri*. *Z.Naturforsch*, 669-674.

Sitepu, J. (1991). *Strategi penanggulangan penyakit layu pseudomonas pada tanaman industri kasus pada tanaman jahe* (Orasi Pengukuhan Ahli Penelitian Utama, 12 Oktober 1991, BALITTRO). Bogor: Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Industri.

Suganda. (1997). *Kromatografi lapis tipis* (Temu Ilmiah Nasional Bidang Farmasi, 7-8 Juli 1997). Bandung: ITB.

Van Soest R.W.M. (1989). *The Indonesian Sponges Fauna: A Status Report*. *Ne&. J. Sea Res* 23 (2). 223-30.

Van Soest, R.W.M. (2002). *System Porifera: a guide to the classification of sponges*. *Kluwer Academic/Plenum Publishers*, 2, 1101-1103.

Verbist, J. F.; Minale, L.; Franz, G.; Sodano, G.; Riccio, R.; Chermann, J. C.; et al.(1998). *Third European Marine Science and Technology Conference*, Lisbon, May 23±27,; Vol. III, Project Synopses, pp. 1215±1229

Volk, W. A., M. F. Wheeler. (1993). *Mirobiologi dasar* (Edisi V) Jilid 2. Penerjemah: Sumartono. Jakarta: Erlangga.

Warren L. (1982). *Encyclopedia of Marine Invertebrates*. Di dalam: Walls JG (ed.).hlm 15 – 28.

Windiasari, D. (2009). *Kimia Farmasi*. Diakses 28 Oktober 2010 dari <http://WordPress.com>.

Lampiran 1. Gambar Spon Laut *Axinella Carteri*



ZNATOR.10924

Gambar 7. Spon laut *Axinella carteri*

Lampiran 2. Uji Pendahuluan Kandungan Kimia Spon Laut *Axinella carteri*

Tabel II. Hasil Uji Pendahuluan Kandungan Kimia Metabolit Sekunder Spon Laut *Axinella carteri*

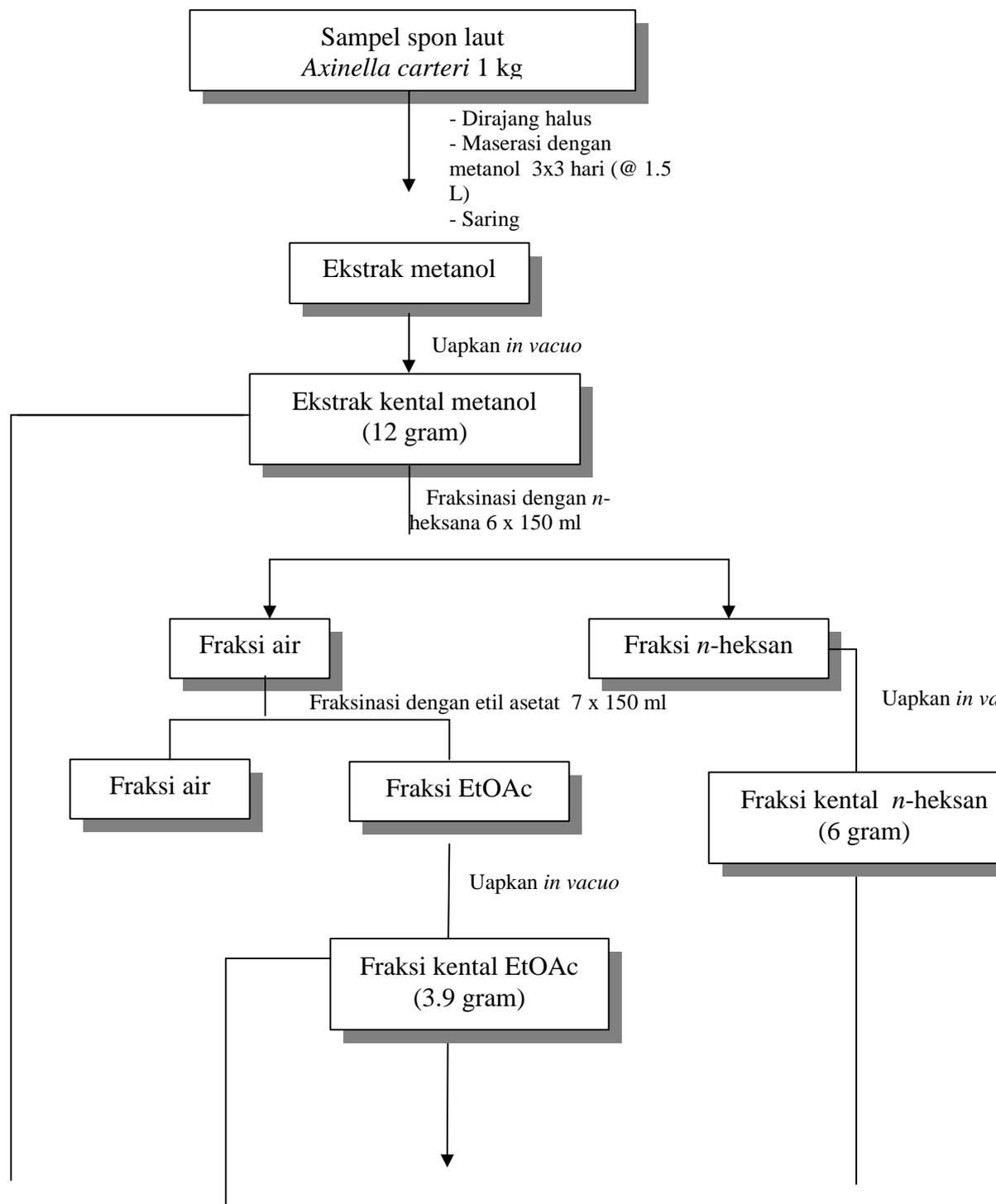
No.	Kandungan Kimia	Pereaksi	Hasil
1.	Alkaloid	Mayer	-
2.	Terpenoid	Asetat anhidrat + As.Sulfat	+
3.	Steroid	Asetat anhidrat + As. Sulfat	-
4.	Fenolik	FeCl ₃	-
5.	Saponin	Air/ Busa	-

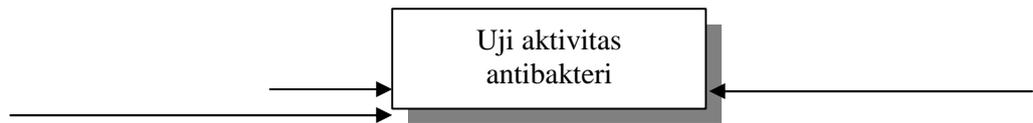
Keterangan :

(+) = Bereaksi

(-) = Tidak bereaksi

Lampiran 3. Skema Ekstraksi dan Fraksinasi Senyawa Antibakteri dari Spon laut *Axinella carteri*





Gambar 8. Skema ekstraksi dan fraksinasi senyawa antibakteri dari spon laut *Axinella carteri*

Lampiran 4. Uji Pendahuluan Aktivitas Antibakteri Hasil Ekstraksi dan fraksinasi dari Spon Laut *Axinella carteri* terhadap bakteri *R. solanacearum*

Tabel III. Hasil Pengukuran Diameter Daerah Hambat Pertumbuhan Bakteri *R. solanacearum* oleh Ekstrak dan Fraksi *Axinella carteri*

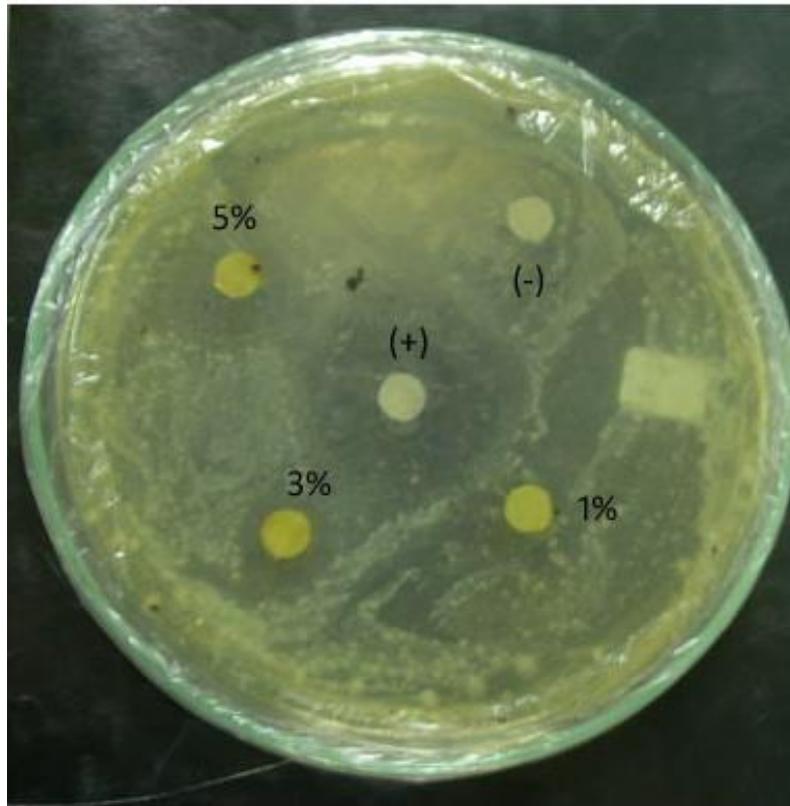
Jenis Pelarut	Diameter Hambat			Kontrol	
	5%	3%	1%	(+)	(-)
Ekstrak Metanol	13mm	12mm	10mm	22mm	-
Fraksi Heksan	11mm	10mm	9mm	22mm	-
Fraksi Etil Asetat	18mm	13mm	8mm	22mm	-

Keterangan :

- Pembanding (K+) : Sterptomisin sulfat (1%) 10 µl
- Pembanding (K-) : DMSO 10 µl

- (-) : Tidak menunjukkan aktivitas
- 5%, 3%, 1% : Konsentrasi Sampel Uji

Lampiran 5. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri terhadap *Ralstonia solanacearum*



Gambar 9. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri fraksi *n*-heksan terhadap *Ralstonia solanacearum*

Keterangan :

- 5%; 3%; 1% : Konsentrasi fraksi *n*-heksan
- Kontrol positif (+) : Streptomisin sulfat (1%) 10 μ l
- Kontrol negatif (-) : DMSO 10 μ l

Lampiran 5. Lanjutan

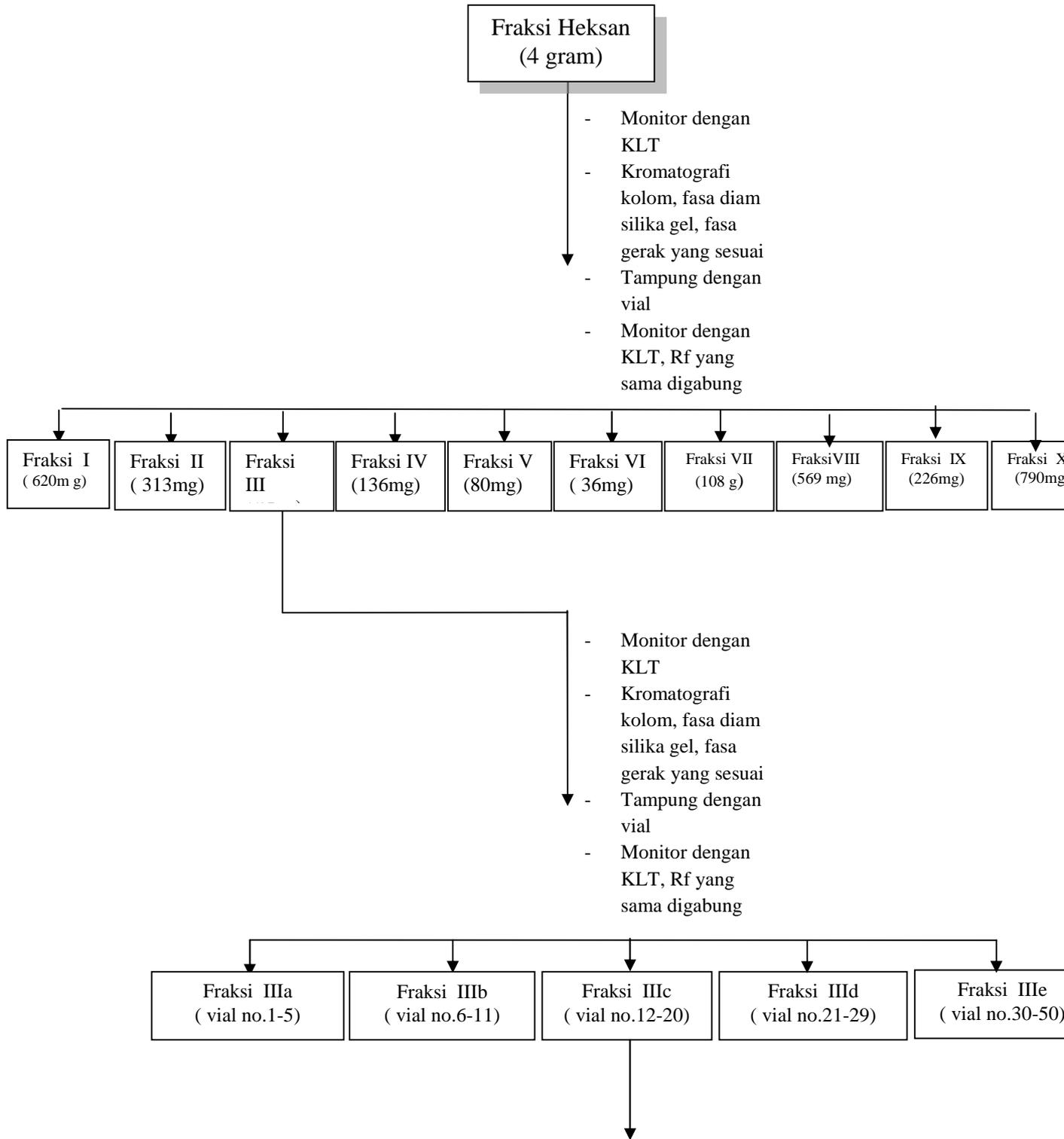


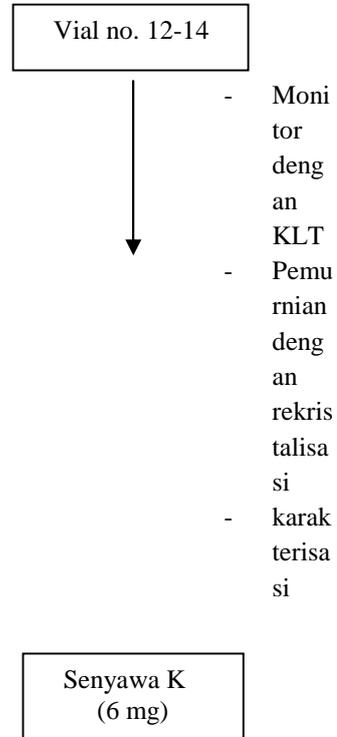
Gambar 10 .Hasil Uji Aktivitas Antibakteri farksis etilasetat terhadap *Ralstonia solanacearum*

Keterangan :

- 5%; 3%; 1%; : Konsentrasi fraksi etilasetat
- Kontrol positif (+) : Streptomisin sulfat (1%) 10 μ l
- Kontrol negatif (-) : DMSO 10 μ l

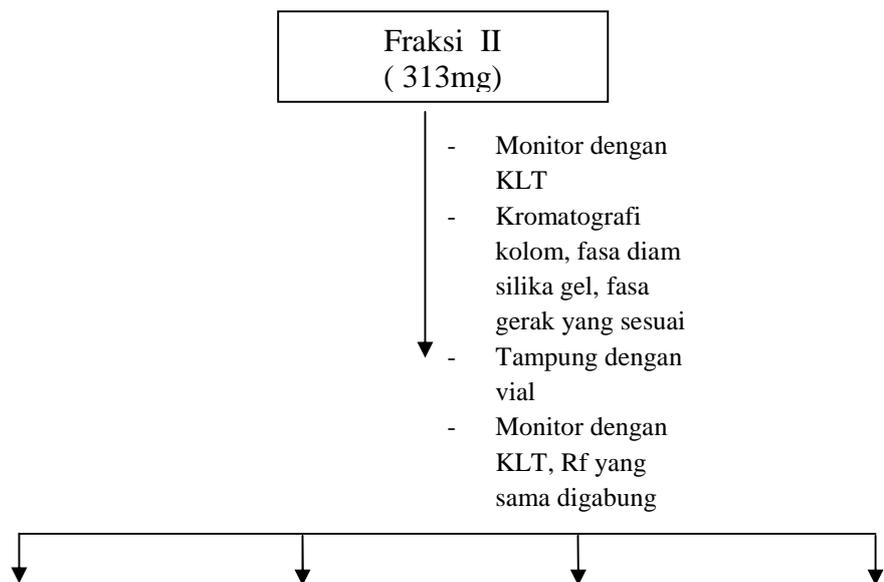
Lampiran 6 . Skema Isolasi Senyawa Antibakteri dari fraksi n-heksan

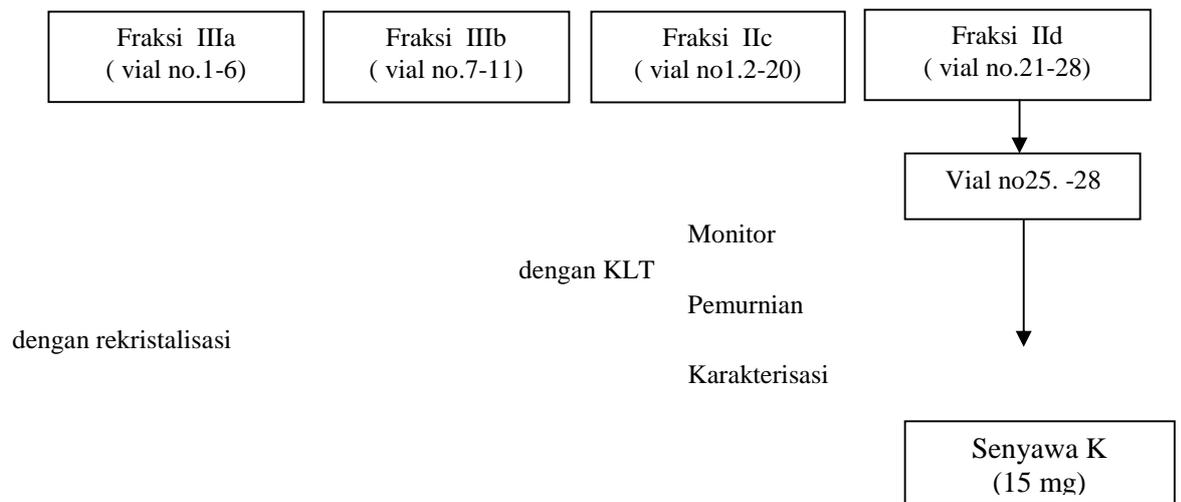




Gambar 11. Skema isolasi senyawa antibakteri dari fraksi non polar spon laut *Axinella carteri*

Lampiran 6 (lanjutan)





Gambar 12. Skema isolasi senyawa K dari fraksi II

Lampiran 7. Pemeriksaan Aktivitas Antibakteri Senyawa Hasil Isolasi dengan Metode Difusi Agar

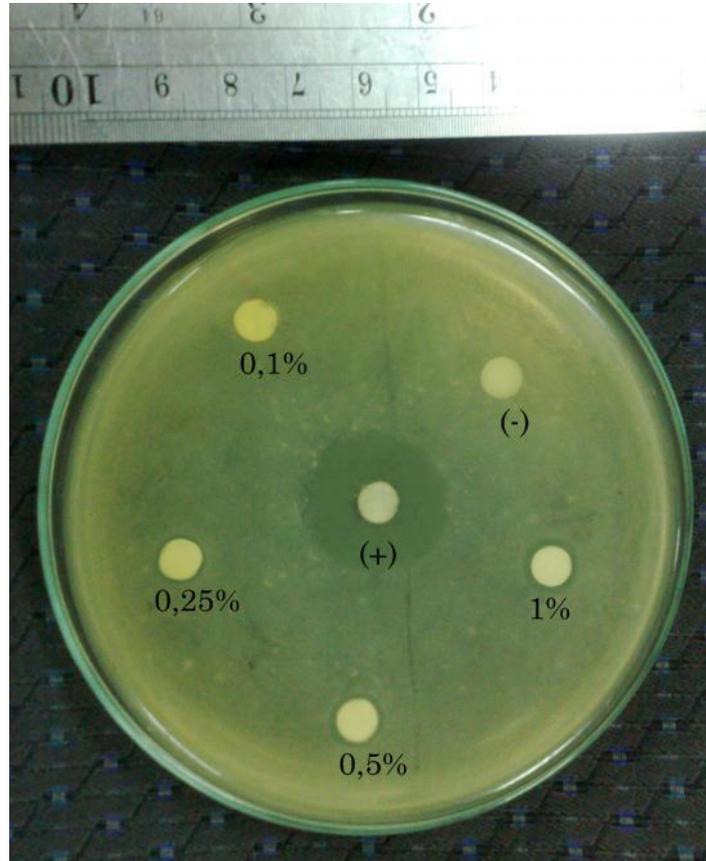
Tabel IV. Hasil Pengukuran Aktivitas Antibakteri dari Senyawa Murni (senyawa K)

Bakter Uji	Konsentrasi Senyawa K (%)					Kontrol (+)	Kontrol (-)
	1%	0.5 %	0.25%	0.1%	0.05%		
<i>Ralstonia Solanacearum</i>	9mm	8mm	7mm	-	-	22mm	-

Keterangan :

- Pembanding (K+) : Streptomisin sulfat (1 %) 10 µl
- Pembanding (K-) : DMSO 10 µl
- (-) : Tidak menunjukkan aktivitas

Lampiran 8. Gambar Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Senyawa K terhadap *Ralstonia solanacearum*

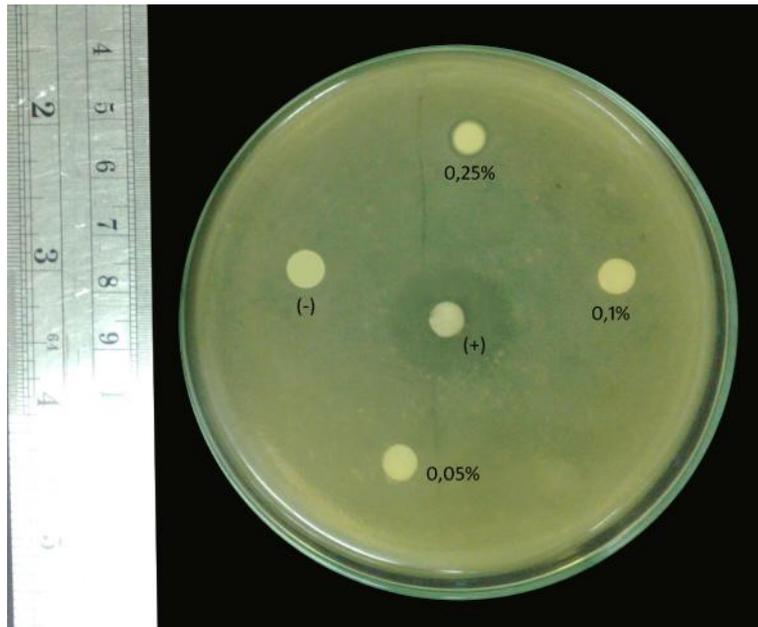


Gambar 13. Gambar Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Senyawa K terhadap *Ralstonia solanacearum*

Keterangan :

- 1%; 0,5%;0,25%;0,1% : Konsentrasi senyawa K
- Kontrol positif (+) : Streptomisin sulfat (1%)
10 μ l
- Kontrol negatif (-) : DMSO 10 μ l

Lampiran 9. Gambar Hasil Uji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) Senyawa K terhadap *Ralstonia solanacearum*



Gambar 14. Gambar Hasil Uji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) Senyawa K terhadap *Ralstonia solanacearum*

Keterangan :

- 0,25%; 0,1%; 0,05% : Konsentrasi senyawa K
- Kontrol positif (+) : Streptomisin sulfat (1%)
10 μ l
- Kontrol negatif (-) : DMSO 10 μ l

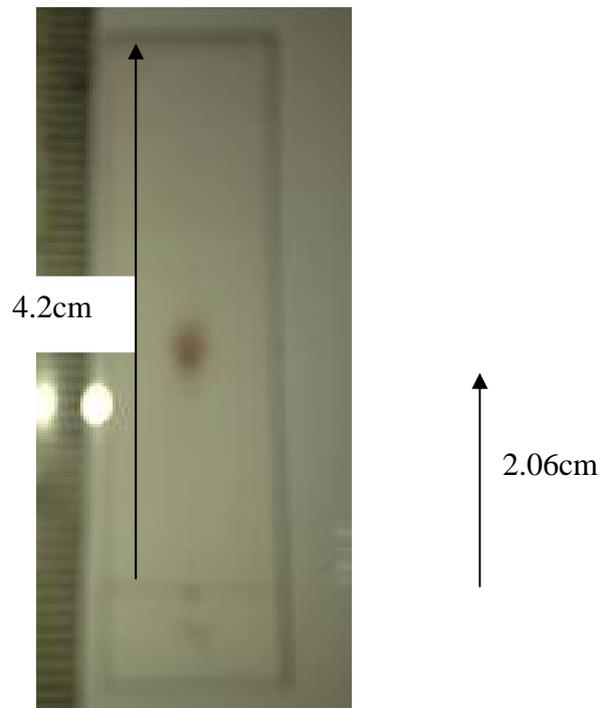
Lampiran 10. Karakterisasi Senyawa Hasil Isolasi

Tabel V. Karakterisasi Senyawa K

No.	Karakterisasi	Senyawa K	Asiaticoside (pembanding sebagai triterpen)
1.	Organoleptis • Bentuk, warna dan bau	Amorf putih, tidak berbau	Amorf putih kekuning- kuningan, tidak berbau
2.	Pemeriksaan fisika • Kelarutan • Suhu terkomposisi	Sangat mudah larut dalam 0.6 bagian heksan, mudah larut dalam 5 bagian etil asetat, larut dalam 30 bagian metanol 144-146°C	Mudah larut dalm metanol, sukar larut dalam heksan

3.	Pemeriksaan dengan Reagent : <ul style="list-style-type: none"> • Dragendorff • Sianidin test • FeCl₃ • Lieberman Bouchard • Vanilin H₂SO₄ • H₂SO₄ 10% dalam MeOH 	Tidak bereaksi Tidak bereaksi Tidak bereaksi Ungu Merah muda-ungu Ungu	Tidak bereaksi Tidak bereaksi Tidak bereaksi Ungu Ungu Ungu
4.	Pemeriksaan KLT	Eluen heksan: etil asetat (7:3) Rf = 0,49	Eluen etil asetat 100 % Rf = 0.4

Lampiran 11. Pola KLT Senyawa K



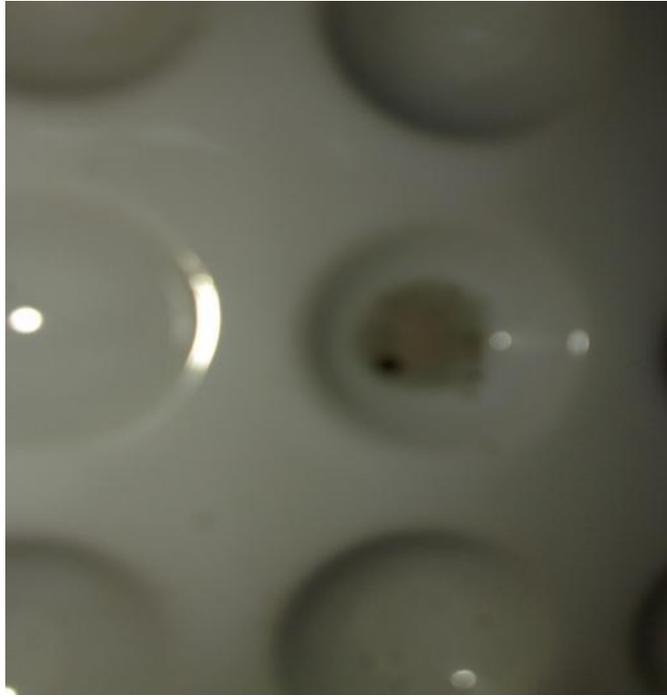
Gambar 15. Pola KLT dari senyawa K

Keterangan :

Senyawa K, Eluen Heksan : etil asetat (7:3) $R_f = 0,49$

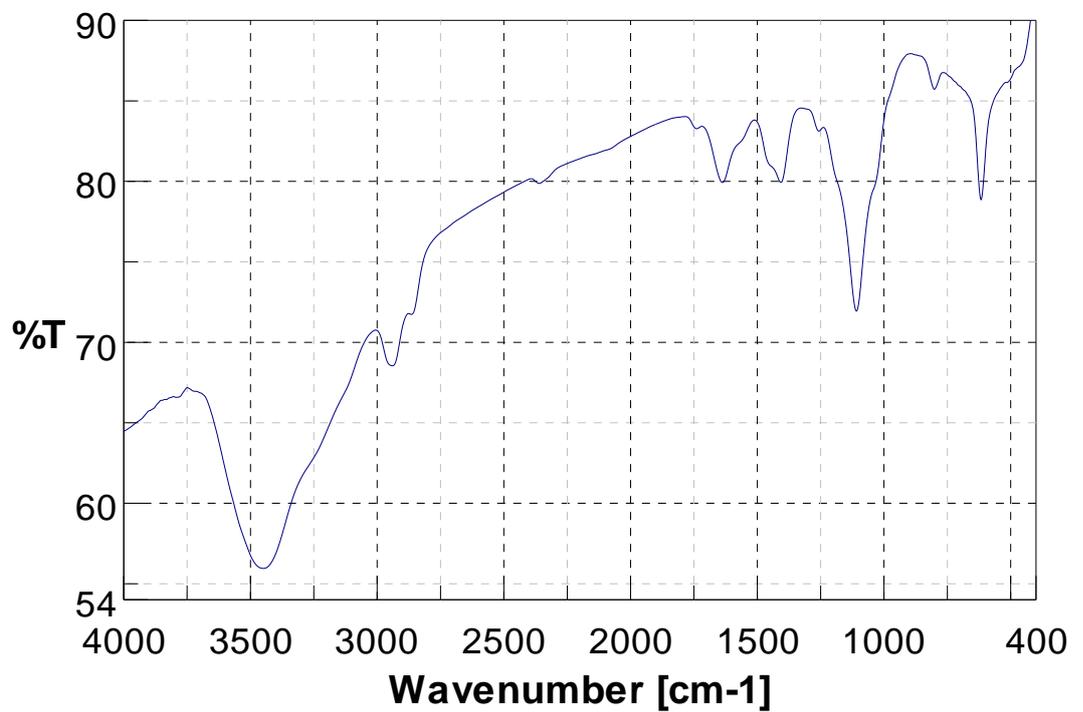
dengan penampak noda Vanilin H_2SO_4

**Lampiran 12. Pemeriksaan senyawa K dengan Preaksi
Lieberman Bourchard**



Gambar 16. Pemeriksaan Senyawa K dengan pereaksi
Liebermann Bourchard

Lampiran 13. Spektrum dan Data Spektroskopi Inframerah Senyawa K



Gambar 17. Spektrum dan Data Spektroskopi Inframerah Senyawa K

Tabel VI. Data Spektroskopi Inframerah Senyawa K

Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)	Keterangan
3448	Regang OH
2939	Regang C-H

1637	Regang C=C
1406	Lentur C-H
1257	Lentur C-H
1108	Lentur C-H
801	Lentur C-H

Lampiran 14

Identifikasi *Ralstonia solanacearum* ras 4

a. Morfologi

Morfologi koloni *Rs* pada tanaman jahe Gajah yang ditumbuhkan pada medium *TTC* yang berbentuk bulat, sedikit cembung, warna koloni merah muda mengkilat, permukaan koloni berlendir dan ukuran koloni >1mm.



Gambar 18. Morfologi *R. solanacearum*

b. Uji Fisiologi

1. Reaksi Gram

Reaksi gram bertujuan untuk mengetahui apakah bakteri bersifat gram negatif atau gram positif. Pengujian ini menggunakan metode klement, dengan cara mengambil satu koloni bakteri yang berumur 2 hari dengan jarum ose lalu dicampurkan satu tetes larutan KOH 3% di atas kaca objek. Bakteri *Rs* bersifat gram negatif, karena terjadi pengumpulan dan melengket.

2. Produksi Pektinase

Produksi pektinase bertujuan untuk mengamati kemampuan bakteri menghasilkan enzim pektinase. Pengujian ini menggunakan metode Schaad, dengan cara kentang dipotong-potong dengan ukuran 1x1 cm, potongan kentang disterilisasi permukaannya, dengan cara dicelupkan kedalam aquadest, setelah itu dimasukan kedalam alkohol 70%, kemudian dibilas. Dua lembar kertas saring disusun dalam cawan Petri dan lembabkan kertas saring tersebut dengan aquadest. Potongan umbi kentang kemudian disusun di atas kertas saring. Ambil satu ose bakteri dan oleskan pada permukaan potongan umbi kentang. Kemudian inkubasi selama 2-3 hari. Pada bagian inokulasi terjadi perubahan warna menjadi coklat dan berlendir dipermukaan atas berarti isolat *Rs* menghasilkan enzim pektinase.



A

B

Gambar 19. Uji pektinase: A) kontrol dan B) perlakuan

3. Reaksi Hipersensitif

Reaksi hipersensitif ini bertujuan untuk mengetahui sifat bakteri yang tergolong patogen. Pengujian dilakukan dengan menggunakan metode Schaad yaitu menggunakan tanaman tembakau (*Nicotina tobaccum*) (bukan inang), suspensi bakteri *Rs* ras 4 (10^8 sel/ml) diinfiltrasi secara interseluler pada jaringan permukaan bawah daun tembakau sampai jenuh, kemudian diselubungi dengan plastik bening untuk menjaga kelembapan. Pada uji ini terjadi perubahan pada bagian daun yang ditandai dengan adanya bagian yang memucat lalu nekrosis dalam waktu 3 hari.



Gambar 20. Bagian daun memucat dan terlihat gejala nekrotik pada umur 3 hari

4. Uji Patogenisitas

Uji patogenisitas bertujuan untuk melihat kemampuan bakteri menimbulkan gejala penyakit pada tanaman inang dan untuk menentukan tingkat virulensi patogen, dengan menggunakan metode Hamzah, yaitu dengan cara, rimpang jahe yang sehat di inokulasi dengan suspensi bakteri (10^8 sel/ml) sebanyak 2 ml menggunakan jarum suntik setelah itu di inkubasi selama 7-10 hari. Pada rimpang jahe terlihat kebasahan dan pada bekas suntikan terjadi lobang-lobang dan ini berbeda dengan kontrol.



Gambar 21. Uji Patogenisitas: A) pada perlakuan terjadi kebasahan
B) pada perlakuan terjadi bolong-bolong

