



Tesis-SK142502

**Penggunaan Minyak Biji Johar (*Senna seamea*
Lam) sebagai Minyak Immersi dan Zat Pewarna
untuk Identifikasi Bakteri**

ANDI NINA ASRIANA
1414201007

DOSEN PEMBIMBING
Dr. rer. nat. Fredy Kurniawan, M.Si

PROGRAM MAGISTER
BIDANG KEAHLIAN KIMIA ANALITIK
JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA
2016



Tesis-SK142502

***Senna seamea* Lam Seed Oil Application As Immersion Oil and Staining Agent For Bacteria Identification**

ANDI NINA ASRIANA
1414201007

SUPERVISOR
Dr. rer. nat. Fredy Kurniawan, M.Si

MASTER PROGRAM
FIELD OF INTEREST ANALYTICAL CHEMISTRY
CHEMISTRY DEPARTMENT
MATHEMATICS AND SCIENCES FACULTY
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA
2016

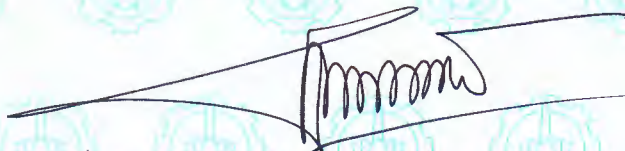
Telah disusun untuk memenuhi salah satu syarat memperoleh gelar
Magister Sains (M.Si)
di

Di Institut Teknologi Sepuluh Nopember

Oleh:
ANDI NINA ASRIANA
NRP. 1414 201 007

Tanggal Ujian : 8 Agustus 2016
Periode Wisuda : September 2016

Disetujui oleh :



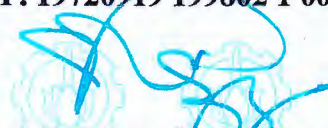
1. Dr. rer. nat. Fredy Kurniawan, M.Si.
NIP. 19740428 199802 1 001

(Pembimbing)



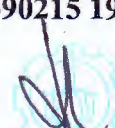
2. Suprpto, M.Si., Ph.D.
NIP. 19720919 199802 1 002

(Penguji)



3. Prof. Dr. R. Y. Perry Burhan, MS.
NIP. 19590215 198701 1 001

(Penguji)



4. Hamzah Fansuri, M.Si., Ph.D.
NIP. 19691017 199412 1 001

(Penguji)



Direktur Program Pascasarjana,



Prof. Ir. Djauhar Manfaat, M.Sc., Ph.D.
NIP. 19601202 198701 1 001

PENGUNAAN MINYAK BIJI JOHAR (*Senna seamea* Lam) SEBAGAI MINYAK IMMERSI DAN ZAT WARNA UNTUK IDENTIFIKASI BAKTERI

Nama Mahasiswa : Andi Nina Asriana
NRP : 1414 201 007
Dosen Pembimbing : Dr. rer. nat. Fredy Kurniawan, M.Si

ABSTRAK

Pada penelitian ini, telah dibuat minyak dari biji tanaman johar (*Senna seamea* Lam) dengan metode ekstraksi menggunakan n-Heksana dan dilanjutkan dengan pemurnian. Biji johar memiliki kadar minyak rendah yakni 13,6%. Minyak yang dihasilkan berwarna kuning kehijauan, dengan indeks bias tinggi (1,44), viskositas bilangan asam dan bilangan peroksida yang rendah (44,9 cp; 16,66 mg KOH/g minyak dan 5,54 meq O₂/1000 g minyak). Hasil pengamatan menunjukkan minyak biji johar mampu mewarnai bakteri Gram negatif dan bakteri tahan asam tapi tidak untuk bakteri Gram positif. Pewarnaan menggunakan minyak biji johar tergolong pewarnaan sederhana.

Kata kunci : bakteri, minyak, *staining*, johar, fisika-kimia

SENNA SEAMEA LAM SEED OIL APPLICATION AS A IMMERSION OIL AND STAINING AGENT FOR BACTERIA IDENTIFICATION

Name of student : Andi Nina Asriana
NRP : 1414 201 007
Supervisor : Dr. rer. nat. Fredy Kurniawan, M.Si

ABSTRACT

Johar (*Senna seamea* Lam) seed oil has been made by n- Hexan solution extraction and refining afterward. Johar seed contained a poor of oil i.e. 13,6%. This oil has a yellow-green colour, with high index refractive (1,41) and lower viscosity, acid value and peroxide value (44,9 cp; 16,66 mg KOH/g of oil dan 5,54 meq O₂/1000 g of oil). The results showed ability of johar seed oil to Gram-negative bacteria and acid-fast bacteria staining but not for Gram-positive bacteria staining. Johar seed oil staining method included in the modest stain.

Keywords : bacteria, oil, johar, staining, physico-chemicaly

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah segala puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas curahan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyusun TESIS yang berjudul **“Penggunaan Minyak Biji Johar (*Senna seamea* Lam) Sebagai Zat Pewarna untuk Identifikasi Bakteri”**

Penulis mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu dan memberikan dukungan dalam penyusunan TESIS ini. Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada :

1. Bapak Dr. rer. nat. Fredy Kurniawan, M.Si. selaku dosen pembimbing atas semua bimbingan, arahan, masukan, nasihat dan motivasi yang berharga dalam penyusunan Tesis ini.
2. Bapak Prof. Mardi Santoso, Ph.D, selaku Kepala Prodi Magister Kimia ITS
3. Bapak Prof. Didik Prasetyoko, M. Sc. Selaku Ketua Jurusan Kimia ITS
4. Bapak Andi Alimuddin Hamzah dan Ibu Andi Rahmawaty Ramli tercinta atas didikan dan doanya sehingga penulis dapat menyelesaikan studi.
5. Andi Amna Rahmi, Andi Riswana Sari, Andi Achmad Rizal, Andi Syafriyana dan Andi Nurul Inzana, sebagai Tim Hore
6. Fajriah Harun, Haeriah, Syslia, Ike Dayi dan Ikhsan sebagai rekan serumah yang seperjuangan di perantauan
7. Opha, Uci, Nadifa, Ipeh, Mb Iis dan Pak Jack sebagai Tim Kriminal di kelas Analitik angkatan 2014
8. Kru Kelas Nusantara yang ribut, ramai, susah diatur tapi tetap solid
9. Personil Laboratorium Instrumentasi dan Analisis Jurusan Kimia
10. Semua pihak yang telah membantu yang tidak mungkin penulis sebutkan satu persatu

Penulis menyadari bahwa dalam TESIS ini masih terdapat kekurangan, oleh karena itu kritik dan saran yang membangun sangat penulis harapkan.

Surabaya, Juli 2016

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	Error! Bookmark not defined.
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR GAMBAR.....	ix
DAFTAR TABEL	xi
BAB 1 PENDAHULUAN	Error! Bookmark not defined.
1.1 Latar Belakang	Error! Bookmark not defined.
1.2 Rumusan Masalah	Error! Bookmark not defined.
1.3 Tujuan Penelitian.....	Error! Bookmark not defined.
1.4 Manfaat Penelitian.....	Error! Bookmark not defined.
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	Error! Bookmark not defined.
2.1 Bakteri	Error! Bookmark not defined.
2.1.1 Klasifikasi Bakteri.....	Error! Bookmark not defined.
2.1.2 Struktur Bakteri.....	Error! Bookmark not defined.
2.1.3 Reproduksi dan Pertumbuhan Bakteri	Error! Bookmark not defined.
2.2 Bakteri Uji	Error! Bookmark not defined.
2.2.1 Bakteri Gram Positif	Error! Bookmark not defined.
2.2.2 Bakteri Gram Negatif.....	Error! Bookmark not defined.
2.2.3 Bakteri Tahan Asam.....	Error! Bookmark not defined.
2.3 Pewarnaan Bakteri.....	Error! Bookmark not defined.
2.3.1 Pewarnaan Sederhana.....	Error! Bookmark not defined.
2.3.2 Pewarnaan Gram	Error! Bookmark not defined.
2.3.3 Pewarnaan Tahan Asam	Error! Bookmark not defined.
2.4 Tumbuhan Johar (Senna siamea Lam)	Error! Bookmark not defined.
2.4.1 Klasifikasi Tanaman Johar	Error! Bookmark not defined.

2.4.2	Minyak Biji Johar.....	Error! Bookmark not defined.
2.5	Mikroskop	Error! Bookmark not defined.
2.5.1	Komponen mikroskop.....	Error! Bookmark not defined.
2.5.2	Macam-macam mikroskop.....	Error! Bookmark not defined.
BAB 3	METODOLOGI.....	Error! Bookmark not defined.
3.1	Alat dan Bahan	Error! Bookmark not defined.
3.1.1	Alat.....	Error! Bookmark not defined.
3.1.2	Bahan.....	Error! Bookmark not defined.
3.2	Prosedur Kerja	Error! Bookmark not defined.
3.2.1	Pembuatan Minyak Biji Johar.....	Error! Bookmark not defined.
3.2.2	Karakterisasi Minyak Johar	Error! Bookmark not defined.
3.2.3	Pewarnaan Bakteri	Error! Bookmark not defined.
BAB 4	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	Error! Bookmark not defined.
4.1	Ekstraksi Minyak Jarak	Error! Bookmark not defined.
4.2	Karakterisasi Minyak Biji Johar.....	Error! Bookmark not defined.
4.3	Hasil Uji Pengamatan dengan Mikroskop.....	Error! Bookmark not defined.
	defined.	
4.3.1	Bakteri Gram Positif	Error! Bookmark not defined.
4.3.2	Bakteri Gram Negatif.....	Error! Bookmark not defined.
4.3.3	Bakteri Tahan Asam.....	Error! Bookmark not defined.
BAB 5	KESIMPULAN DAN SARAN.....	xii
5.1	Kesimpulan.....	xii
5.2	Saran.....	xii
	DAFTAR PUSTAKA	xiii
	LAMPIRAN	Error! Bookmark not defined.
	BIOGRAFI PENULIS	Error! Bookmark not defined.

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Dinding sel bakteri Gram positif secara umum (Silhavy dkk, 2010)		Error! Bookmark not defined.
Gambar 2.2 <i>Bacillus subtilis</i> (JCM no. 12233).....		Error! Bookmark not defined.
Gambar 2.3 <i>Staphylococcus aureus</i> (JCM no. 19279)		Error! Bookmark not defined.
Gambar 2.4 <i>Lactobacillus</i> sp (JCM no. 1102)		Error! Bookmark not defined.
Gambar 2.5 Dinding sel bakteri Gram negatif secara umum (Silhavy dkk, 2010)		Error! Bookmark not defined.
Gambar 2.6 <i>Escherichia coli</i> (JCM no. 16575).....		Error! Bookmark not defined.
Gambar 2.7 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (JCM no. 14847)		Error! Bookmark not defined.
Gambar 2.8 <i>Salmonella typhi</i> (JCM no. 1652)		Error! Bookmark not defined.
Gambar 2.9 Dinding sel bakteri tahan asam secara umum		Error! Bookmark not defined.
Gambar 2.10 <i>Helicobacter pylori</i> (JCM no. 12093)		Error! Bookmark not defined.
Gambar 2.11 <i>Rickettsia ricketti</i> (JCM no. 01723) ..		Error! Bookmark not defined.
Gambar 2.12 <i>Vibrio cholera</i> (JCM no. 14049).....		Error! Bookmark not defined.
Gambar 2.13 Tanaman Johar a)pohon, b) buah, dan c) biji		Error! Bookmark not defined.
Gambar 2.14 Gambar alat mikroskop		Error! Bookmark not defined.
Gambar 4.1 Minyak biji johar hasil ekstraksi		Error! Bookmark not defined.
Gambar 4.2 Reaksi fosfatida dengan asam fosfat ..		Error! Bookmark not defined.
Gambar 4.3 Minyak hasil pemurnian a) penghilangan getah, b) pemucatan, c) netralisasi, d) winterisasi		Error! Bookmark not defined.
Gambar 4.4 Reaksi penyabunan.....		Error! Bookmark not defined.
Gambar 4.5 Fokus cahaya berdasarkan peningkatan NA (Zeiss Microscopy)		Error! Bookmark not defined.
Gambar 4.6 Spektra UV-VIS minyak biji johar.....		Error! Bookmark not defined.

Gambar 4.7 FTIR pheopitin dengan minyak johar **Error! Bookmark not defined.**

Gambar 4.8 *Basillus subtilis* a) tanpa pewarna B) Pewarnaan Gram c) minyak johar
.....**Error! Bookmark not defined.**

Gambar 4.9 *Staphylococcus aureus* a)tanpa pewarnaan, b)pewarna Gram dan
c)minyak biji johar**Error! Bookmark not defined.**

Gambar 4.10 *Lactobacillus* sp a)tanpa pewarnaan, b)pewarna Gram dan c) minyak
biji johar**Error! Bookmark not defined.**

Gambar 4.11 *Eschericia Coli* a) tanpa pewarna, b) pewarnaan Gram dan c) minyak
biji johar**Error! Bookmark not defined.**

Gambar 4.12 *Pseudimonas aeruginosa* a) tanpa pewarnaan, b) pewarnaan Gram dan
c) minyak biji johar**Error! Bookmark not defined.**

Gambar 4.13 *Salmonella typhi* a) tanpa pewarnaan, b) pewarnaan Gram dan c)
minyak biji johar**Error! Bookmark not defined.**

Gambar 4.14 *Rickettsia ricketti* (a) tanpa pewarnaan, (b) pewarnaan Gram dan (c)
minyak biji johar**Error! Bookmark not defined.**

Gambar 4.15 *Vibrio cholera* (a) tanpa pewarnaan, (b) pewarnaan Gram dan (c)
minyak biji johar**Error! Bookmark not defined.**

Gambar 4.16 *Helicobacter Pylory* (a) tanpa pewarnaan, (b) pewarnaan Gram, (c)
minyak biji johar**Error! Bookmark not defined.**

DAFTAR TABEL

Tabel 2-1 Sifat fisika minyak biji johan**Error! Bookmark not defined.**

Tabel 4-1 Sifat fisika-kimia minyak biji jarak**Error! Bookmark not defined.**

KESIMPULAN DAN SARAN

1.1 Kesimpulan

Minyak biji Johar (*Senna seamea* Lam) berhasil diperoleh dengan metode ekstraksi dan pemurnian. Biji johar yang diekstraksi memiliki kadar minyak yang rendah yakni 13,6%. Minyak murni tampak pudar dan tidak keruh dibandingkan minyak kasar yang berwarna gelap dan sangat keruh.

Karakterisasi minyak biji johar menampilkan sifat fisika-kimia yang sangat sesuai dijadikan minyak immersi dan zat pewarna pada bakteri. Minyak biji johar memiliki indeks bias lebih tinggi sehingga mampu meningkatkan *Numerical Aparatur*. Zat pewarna yang dimiliki minyak ini adalah pheopitin dan bersifat non-polar. Hal inilah yang dimanfaatkan untuk pewarnaan bakteri Gram negatif dan bakteri tahan asam (BTA) yang memiliki membran luar yang tersusun oleh lipopolisakarida yang bersifat nonpolar dan hidrofobik (Dewi, 2010).

Hasil pengamatan bakteri tanpa pewarnaan, dengan pewarnaan Gram dan pewarnaan dengan minyak biji johar menampilkan kualitas visual yang berbeda. Tanpa pewarnaan, morfologi bakteri tidak terlihat, sebab bakteri umumnya tidak memiliki pigmen. Pewarnaan Gram khususnya kristal violet, spesifik untuk bakteri Gram positif, sedangkan safranin spesifik untuk bakteri Gram negatif. Untuk BTA yang tergolong bakteri Gram negatif, menunjukkan visual yang kurang baik terhadap safranin namun sangat baik dengan menggunakan minyak biji johar.

Pengamatan menggunakan minyak biji johar juga dapat dilakukan pada sel hidup walaupun bersifat patogen, oleh sebab itu pewarnaan ini tergolong pewarnaan sederhana. Metode pewarnaan sederhana memungkinkan diperolehnya data visual secara cepat dan *realtime*.

1.2 Saran

Penggunaan minyak biji johar sebagai zat pewarna untuk identifikasi bakteri hanya bisa dilihat pengaruhnya melalui pengamatan dibawah mikroskop. Oleh karena itu, perlu dilakukan studi lebih lanjut mengenai interaksi antara zat pewarna dengan membran sel bakteri.

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Mikroskop merupakan instrumen untuk analisis kualitatif yang terus dikembangkan untuk meningkatkan kualitas visual suatu objek analisis. Pengembangan instrumen mikroskop salah satunya berkaitan dengan peningkatan nilai NA (*Numerical Aparatur*). Semakin tinggi nilai NA maka fokus cahaya pada objek analisis semakin meningkat. Salah satu cara meningkatkan nilai NA adalah dengan menggunakan minyak immersi. Minyak immersi merupakan cairan yang memiliki indeks bias. Makin tinggi nilai indeks bias maka makin tinggi nilai NA dan makin jelas juga pengamatan objeknya. Salah satu objek yang sering diamati dengan mikroskop adalah bakteri (Ippolito dkk, 2005).

Bakteri merupakan mikroorganisme bersel tunggal yang termasuk dalam golongan prokariotik (tidak memiliki membran inti) yang dapat hidup dan berkembang di berbagai media. Bakteri ini ada yang bersifat menguntungkan dan ada yang patogenesis. Oleh sebab itu, identifikasi mikroorganisme ini sangat penting dalam berbagai bidang, termasuk kesehatan masyarakat, diagnosis klinis, pemantauan lingkungan, keamanan pangan monitoring, dan identifikasi ancaman senjata biologis. Prosedur untuk karakterisasi dan identifikasi bakteri terus dikembangkan agar dapat menyediakan data dengan cepat berikut informasi taksonomi yang relevan untuk seluruh populasi (Emerson dkk, 2008).

Metode identifikasi bakteri yang telah menjadi standar untuk identifikasi dan karakteristik bakteri yang tidak diketahui yakni metode pewarnaan (*staining*). Metode pewarnaan digunakan sebab bakteri tidak dapat mengabsorpsi dan membiaskan cahaya. Oleh sebab itu digunakan zat warna untuk mewarnai bakteri. Zat warna ini mampu mengadsorpsi dan membiaskan cahaya sehingga kontras antara bakteri dengan lingkungannya dapat ditingkatkan. Penggunaan zat warna memungkinkan pengamatan struktur dan morfologi bakteri (Indan, 2003).

Zat warna yang paling sering digunakan untuk mewarnai bakteri adalah kristal violet dan safranin. Penggunaan zat warna ini dikenal dengan istilah *Gram*

Staining. Metode ini adalah teknik diferensial pewarnaan yang digunakan untuk menentukan ciri bakteri Gram positif dan Gram negatif. Bakteri Gram positif dapat mempertahankan warna ungu yakni warna dari kristal violet sedangkan bakteri Gram negatif kehilangan warna kristal violet namun dapat didekolorisasi menggunakan safranin hingga berwarna merah. Bakteri Gram negatif yang telah didekolorisasi namun tidak dapat mempertahankan warna merah safranin disebut sebagai BTA (Bakteri Tahan Asam) (Korapati, 2010).

BTA adalah bakteri yang tidak mudah terdenaturasi oleh asam. Oleh sebab itu bakteri ini tergolong dalam bakteri patogen. Penelitian yang dilakukan Datta dkk, (2015) untuk menentukan kinerja *Fluorescein diasetat* (FDA) sebagai pewarna yang penting dalam mendeteksi kelangsungan hidup BTA (secara *in vivo*). FDA merupakan metode pewarnaan bakteri yang menggunakan teknik berdasarkan prinsip intraseluler hidrolisis FDA. Prinsip dari FDA ini adalah konversi FDA nonfluorescent ke senyawa fluorescent berwarna hijau. berdasarkan aktivitas reaksi enzimatik. Akan tetapi pengamatan ini bukan merupakan pengamatan morfologi namun merupakan pengamatan aktifitas reaksi enzimatik dengan menggunakan instrumen fluoroscence.

Selain itu, senyawa kromofor 1-Zn (di mana 1 adalah (E)-4-(4-imetilamino-penilazo)-N,N-bispiridin-2-ylmetil-benzenesulfonamida) juga dapat digunakan sebagai agen pewarnaan untuk sel bakteri yang berbeda melalui pengikatan adenosin trifosfat (ATP). Pengikatan ATP dalam larutan air pada pH yang tepat dapat menyebabkan perubahan warna. Untuk prokariota (bakteri) yang tidak memiliki mitokondria, maka ATP dihasilkan pada membrane sel. Membran sel yang telah berubah warna dapat dilihat menggunakan mikroskop cahaya. Oleh sebab itu, reagen ini bahkan bisa digunakan untuk membedakan bakteri Gram-positive dan bakteri Gram-negatif. Agen pewarna ini ditemukan nonlipofilik di alam dan tidak beracun sehingga bakteri yang diwarnai tetap bertahan hidup walaupun setelah diwarnai (Ghosh dkk, 2008).

Agen pewarna yang bersifat lipofilik merupakan zat warna yang larut dalam minyak. Golongan minyak yang berwarna dan berasal dari alam adalah minyak nabati seperti minyak biji johan. Minyak biji johan termasuk merupakan minyak *Cassia* yang memiliki indeks bias yang tinggi. Oleh karena itu, pada penelitian ini

dilakukan pewarnaan bakteri menggunakan minyak biji johan sebagai zat pewarna sekaligus minyak immersi untuk variasi bakteri yang tergolong bakteri Gram positif, bakteri Gram negatif dan BTA.

1.2 Rumusan Masalah

Pada penelitian ini, dilakukan pewarnaan sederhana menggunakan minyak biji johan untuk identifikasi bakteri dibawah pengamatan mikroskop. Permasalahan yang dihadapi dalam penelitian ini adalah:

1. Pengaruh jenis bakteri terhadap visualisasi pewarnaan bakteri dibawah pengamatan mikroskop.
2. Perbandingan jenis pewarna terhadap visualisasi pewarnaan bakteri dibawah pengamatan mikroskop

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh minyak biji johan yang dapat dimanfaatkan sebagai minyak immersi sekaligus zat pewarna bakteri untuk pengamatan dibawah mikroskop.

1.4 Manfaat Penelitian

Hasil dalam penelitian ini diharapkan dapat memberikan pengetahuan dan kontribusi terhadap perkembangan penelitian tentang identifikasi bakteri menggunakan zat pewarna. Identifikasi bakteri tersebut diharapkan dapat bermanfaat untuk klasifikasi bakteri, indikasi penyakit dan kontrol lingkungan.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bakteri

Bakteri berasal dari kata *bakterion* (Yunani= batang kecil). Didalam klasifikasi bakteri digolongkan dalam divisio Schizomycetes. Bakteri dari kata latin *bacterium* (jamak, *bacteria*), adalah kelompok raksasa dari organisme hidup. Mereka sangatlah kecil dan kebanyakan uniseluler, dengan struktur sel yang relative sederhana tanpa nucleus atau inti sel, cytoskeleton, dan organel lain seperti mitokondria dan kloroplas. Bakteri pertama ditemukan oleh Anthony van Leeuwenhoek pada tahun 1674 dengan menggunakan mikroskop buatannya sendiri. Istilah *bacterium* diperkenalkan dikemudian hari oleh Ehrenburg pada tahun 1828

Bakteri merupakan mikroorganisme yang termasuk dalam golongan prokariotik yang bersel satu, berkembangbiak dengan membelah diri dan bahan-bahan genetiknya tidak terbungkus dalam membran inti. Pada umumnya bakteri tidak mempunyai klorofil, kecuali beberapa spesies tertentu yang mempunyai pigmen fotosintesis. Oleh karena itu, ada bakteri yang hidupnya heterotrof dan ada juga bakteri yang hidup autotrof. Bakteri heterotrof dapat dibedakan menjadi bakteri yang hidup sebagai parasit dan saprofit, Sedangkan bakteri autotrof dapat dibedakan berdasarkan atas sumber energi yang digunakan untuk mensintesis makanannya menjadi bakteri fotoautotrof dan kemoautotrof. Bakteri dapat hidup dimana saja, ada yang merugikan manusia, hewan maupun tumbuhan. Namun demikian ada juga bakteri yang menguntungkan bagi umat manusia.

Beberapa kelompok bakteri dikenal sebagai agen penyebab [infeksi](#) dan [penyakit](#), sedangkan kelompok lainnya dapat memberikan manfaat dibidang [pangan](#), [pengobatan](#), dan [industri](#). Struktur sel bakteri relatif sederhana: tanpa [nukleus](#) atau inti sel, [kerangka sel](#), dan [organel](#)-organel lain seperti [mitokondria](#) dan [kloroplas](#). Hal inilah yang menjadi dasar perbedaan antara [sel prokariot](#) dengan sel [eukariot](#) yang lebih kompleks (Brooks dkk, 2004).

2.1.1 Klasifikasi Bakteri

Berdasarkan bentuk morfologinya, maka bakteri dapat dibagi atas tiga bagian, yakni :

2.1.1.1 Bentuk basil

Basil dari kata *bacillus*, merupakan bakteri yang bentuknya menyerupai batang atau silinder, membelah dalam satu bidang. Basil dapat berupa batang tunggal, berpasangan atau bentuk rantai pendek dan panjang. Bentuk basil dapat dibedakan atas:

- a. Bentuk tunggal, yaitu basil yang terlepas satu sama lain dengan ujung-ujungnya yang tumpul
- b. Diplobasil, yaitu basil yang bergandengan dua-dua dengan ujung-ujungnya yang tumpul.
- c. Streptobasil, yaitu basil yang bergandengan panjang dengan kedua ujungnya yang tumpul

2.1.1.2 Bentuk kokus

Kokus adalah bakteri yang berbentuk bulat (oval) dan kubus, ada yang hidup sendiri dan ada yang dijumpai hidup berpasangan dan membentuk rantai panjang, bergantung pada cara membelah diri dan melekat satu sama lain selama proses pembelahan. Bentuk kokus ini dapat dibedakan atas :

- a. diplokokus, yaitu kokus yang bergandengan dua
- b. Tetrakokus, yaitu kokus yang mengelompok empat
- c. stapilokokus, yaitu kokus yang berbentuk untaian
- d. streptokokus yaitu kokus yang berbentuk rantai panjang
- e. sarsina, yaitu kokus yang berbentuk kubus

2.1.1.3 Berbentuk spiral

Kelompok bakteri ini terdiri atas bakteri berbentuk silinder, yang bukan lurus seperti basil melainkan melongkar. Bakteri berbentuk spiril ini dibedakan menjadi beberapa jenis antara lain:

- a. Vibrio, yaitu bakteri yang berbentuk batang melengkung menyerupai koma, ada yang tumbuh sebagai benang-benang membelit atau berbentuk “s”.
- b. Spiril, yaitu dari kata spirillum yang menyerupai spiral atau lilitan yang sebenarnya.

- c. Spirochaeta, yaitu merupakan bakteri spiral, tetapi bakteri ini memiliki spiril yang bersifat fleksibel (mampu melenturkan dan melekkukan tubuhnya sambil bergerak)

Berdasarkan tempat kedudukan flagel, maka bakteri dapat diklasifikasikan sebagai berikut :

- a. Monotrik, jika flagel hanya satu dan melekat pada ujung sel
- b. Lofotrik, jika flagel yang melekat pada salah satu ujung sel banyak
- c. Amfitrik, jika flagel melekat pada kedua ujung sel masing-masing satu flagel
- d. Peritrik, jika flagel tersebar dikedua sisi sel
- e. Atrik, jika tidak memiliki flagel

2.1.2 Struktur Bakteri

Semua bakteri kecuali mycoplasma, selnya dikelilingi oleh dinding sel yang kompleks. Disekitar dinding sel bisa ditemukan berbagai struktur eksternal yang melekat seperti kapsul, flagella dan pili.

Peptidoglikan adalah polimer kompleks yang terdiri dari tiga bagian : *backbone*, yang terdiri dari N-asetilglukosamin dan asam N-asetilmuramat dan sekelompok *identical peptide-cross bridges*. Backbone pada semua bakteri adalah sama, namun rantai tetrapeptida dan identical peptide-cross bridges berbeda-beda.

Karbon nomor tiga pada asam N-asetilmuramat disubstitusi oleh gugus eter laktil yang merupakan turunan piruvat. Gugus eter laktil menghubungkan *backbone* dengan rantai samping peptida yang mengandung L-alanin (L-ala), D-glutamat (D-glu), asam diaminopimelat (DAP), dan D-alanin (D-ala). Untai peptidoglikan disusun diruang periplasma dari sepuluh sub unit asam muramat. Lalu unta tersebut saling berhubungan membentuk molekul glikan yang kontinu yang dapat meliputi seluruh sel. Rantai tetrapeptida yang berasal dari *glican backbone* dapat saling bersilangan dengan ikatan interpeptida antara gugus amino bebas pada DAP dan gugus karboksil bebas pada D-ala terdekat.

Penyusunan peptidoglikan pada bagian luar membran plasma dimediasi oleh enzim periplasma, yaitu transglicosilase, transpeptidase dan karboksipeptidase. Tempat ini merupakan sasaran dari antibiotik golongan β -Laktam yang bekerja dengan cara menghambat transpeptidase dan karboksipeptidase selama pembentukan peptidoglikan pada dinding sel.

Glycan backbone dari molekul peptidoglikan dapat dipecah oleh enzim yang dinamakan lisozim yang ada diserum binatang, jaringan dan sekret, serta di lisosom fagosit. Fungsi lisozim adalah melisis sel bakteri sebagai pertahanan konstitutif melawan bakteri patogen. Sasaran pemecahan oleh lisozim adalah ikatan 1,4 antara Asam N-asetilmuramat dan N-asetilglukosamin

2.1.3 Reproduksi dan Pertumbuhan Bakteri

Semua bakteri berkembang biak melalui pembelahan biner (aseksual) dimana dari satu sel membelah menjadi dua sel yang identik. Beberapa bakteri dapat membentuk struktur reproduktif yang lebih kompleks yang memfasilitasi penguraian dua sel yang baru terbentuk.

Pertumbuhan bakteri yang terkontrol akan melewati tiga fase yang berbeda. Biasanya semua kultur bakteri dimulai dari penyediaan kumpulan bakteri yang akan dikembangkan lalu diencerkan dalam media agar. Selanjutnya masuklah koloni tersebut kedalam fasa pertama, yaitu *lag phase*. *Lag phase* adalah fase pertumbuhan lambat. Hal ini disebabkan akibat pertumbuhan bakteri untuk beradaptasi dengan lingkungannya demi mencapai fase pertumbuhan cepat. *Lag phase* memiliki tingkat biosintetik tinggi dimana enzim yang dibutuhkan untuk mencerna berbagai macam substrat dihasilkan dalam jumlah yang banyak.

Fase kedua adalah *log phase* yang dikenal sebagai fase logaritmik atau fase eksponensial. Tingkat dimana sel berkembang biak pada fase ini disebut *growth rate* (k). Waktu yang dibutuhkan sel untuk membelah diri menjadi dua bagian dalam fase ini disebut *generation time* (g). Selama *log phase*, nutrisi dicerna pada kecepatan maksimal sampai semuanya habis. Lalu, masuklah koloni tersebut kedalam fasa ketiga, fase stasioner.

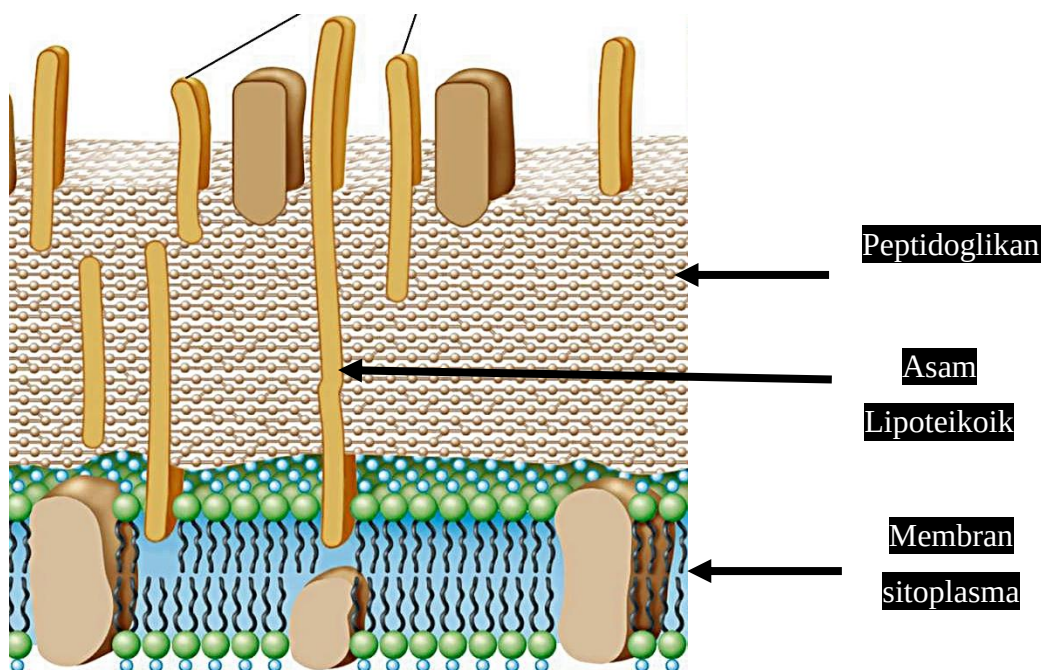
Fase stasioner ditandai dengan habisnya nutrisi yang tersedia. Sel mulai menghentikan aktifitas metabolisme serta menghancurkan protein nonesensial yang dimiliki. Fasa stasioner merupakan masa transisi dari perkembangan yang sangat cepat menuju masa dormansi. Fasa terakhir yang dilewati bakteri adalah fase penurunan. Setelah periode waktu pada fase stasioner yang bervariasi pada tiap organisme dan kondisi kultur, kecepatan kematian meningkat sampai mencapai tingkat yang tetap. Sering kali setelah mayoritas sel mati, kecepatan kematian

menurun drastis, sehingga sejumlah kecil sel yang hidup akan bertahan selama beberapa bulan atau tahun (Dwidjoseputro, 2005).

2.2 Bakteri Uji

2.2.1 Bakteri Gram Positif

Menurut Silhavy dkk (2010), bakteri Gram positif adalah [bakteri](#) yang mempertahankan [zat warna metil ungu](#) sewaktu proses [pewarnaan Gram](#). Bakteri jenis ini akan berwarna biru atau ungu di bawah pengamatan mikroskop. Bakteri ini memiliki lapisan peptidoglikan tebal yang membedakannya dengan bakteri Gram negatif. Berdasarkan Gambar 2.1, terdapat asam teikhoik dan lipoid yang membentuk lapisan asam lipoteikhoik yang berguna untuk *chelating agen* dan untuk adhesi tipe tertentu. Beberapa contoh bakteri gram positif yang penting diidentifikasi yakni *Bacillus subtilis*, *Stapillococcus aureus*, dan *Lactobacillus sp.*



Gambar 2.1 Dinding sel bakteri Gram positif secara umum (Silhavy dkk, 2010)

2.2.1.1 *Bacillus subtilis*

Bakteri ini adalah jenis bakteri yang umum ditemukan di tanah, air, udara dan materi tumbuhan yang terdekomposisi. Termasuk kelompok bakteri gram

positif, aerobik, berbentuk batang dan mampu membentuk endospora seperti pada Gambar 2.2 (Madigan dkk, 2010).

Penggunaan *Bacillus subtilis* umumnya untuk akuakultur, pakan hewan darat, dan konsumsi manusia dalam bakterioterapi gangguan pencernaan dengan cara berasosiasi dengan makanan inang untuk masuk ke dalam saluran pencernaan (Brooks dkk, 2004)



Gambar 2.2 *Bacillus subtilis* (JCM no. 12233)

Bacillus subtilis memiliki kemampuan memproduksi antibiotik dalam bentuk lipopeptida, salah satunya adalah iturin. Iturin membantu *Bacillus subtilis* berkompetisi dengan mikroorganisme lain sebagai antibiotik bagi mikroorganisme lain atau menurunkan tingkat pertumbuhannya. Iturin juga memiliki aktivitas antibiotik terhadap bakteri dan virus patogen (Montet dan Ray, 2011) . Berikut adalah klasifikasi *Bacillus subtilis* :

Kingdom : Bacteria

Filum : Firmicutes

Kelas : Bacilli

Ordo : Bacillales

Famili : Bacillaceae

Genus : Bacillus

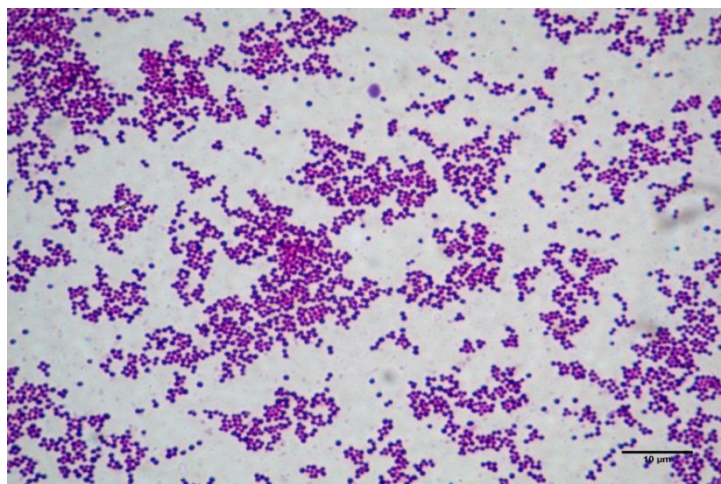
Spesies : *Bacillus subtilis*

2.2.1.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus pertama kali digambarkan oleh Anton Rosenbach seorang dokter asal Jerman pada tahun 1884 (Freeman-Cook, 2006). *Staphylococcus aureus* bersifat non-motil (tidak bisa bergerak), tidak membentuk spora dan tumbuh secara berkelompok menyerupai buah anggur seperti pada Gambar 2.3. Bakteri Gram positif ini mempunyai diameter 1 μm dan berbentuk kokus (bulat) (Jawetz, 2010). Secara biokimia, semua *Staphylococci* dapat memproduksi. *Staphylococcus aureus* dapat memproduksi koagulase yaitu suatu enzim yang dapat menyebabkan plasma menggumpal dengan mengaktivasi protrombin (Panizzi dkk, 2011)

Berikut klasifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* :

- Divisi (Division) : Eukariota
- Kelas (Class) : Schizomycetes
- Bangsa (ordo) : Eubacteriales
- Suku (Familia) : Micrococcaceae
- Marga (Genus) : *Staphylococcus*
- Jenis (Spesies) : *Staphylococcus aureus*



Gambar 2.3 *Staphylococcus aureus* (JCM no. 19279)

Staphylococcus aureus seperti pada Gambar 2.3 adalah bakteri berbentuk bulat, tidak membentuk spora serta flagel dan bersifat gram positif, biasanya tersusun

dalam rangkaian tidak beraturan seperti buah anggur. Beberapa diantaranya tergolong flora normal pada kulit dan selaput mukosa manusia, menyebabkan penanahan, abses, berbagai infeksi piogen dan bahkan septikimia yang fatal. *S. aureus* mengandung polisakarida dan protein yang berfungsi sebagai antigen dan merupakan substansi penting didalam struktur dinding sel(Foster, 1996).

Infeksi oleh *S. aureus* ditandai dengan kerusakan jaringan yang disertai abses bernanah. Beberapa penyakit infeksi yang disebabkan oleh *S. aureus* adalah bisul, jerawat, impetigo, dan infeksi luka. Infeksi yang lebih berat diantaranya pneumonia, mastitis, plebitis, meningitis, infeksi saluran kemih, osteomielitis, dan endokarditis. *S. aureus* juga merupakan penyebab utama infeksi nosokomial, keracunan makanan, dan sindroma syok toksik (Welsh et al., 2010). Kontaminasi langsung *S. aureus* pada luka terbuka (seperti luka pasca bedah) atau infeksi setelah dan meningitis setelah fraktur tengkorak, merupakan penyebab infeksi nosokomial (Ring dkk, 2014)

2.2.1.3 Lactobacillus sp

Seperti pada Gambar 2.4 *Lactobacillus* sp merupakan bakteri asam laktat yang tergolong kelompok bakteri Gram positif berbentuk kokus atau batang, tidak membentuk spora, dan tumbuh pada suhu optimum 40°C . Pada umumnya bakteri ini bersifat anaerob, tidak motil, katalase negatif dan oksidase positif, dengan asam laktat sebagai produk utama fermentasi karbohidrat.

Klasifikasi bakteri asam laktat genus *Lactobacillus*:

Kingdom : Bacteria

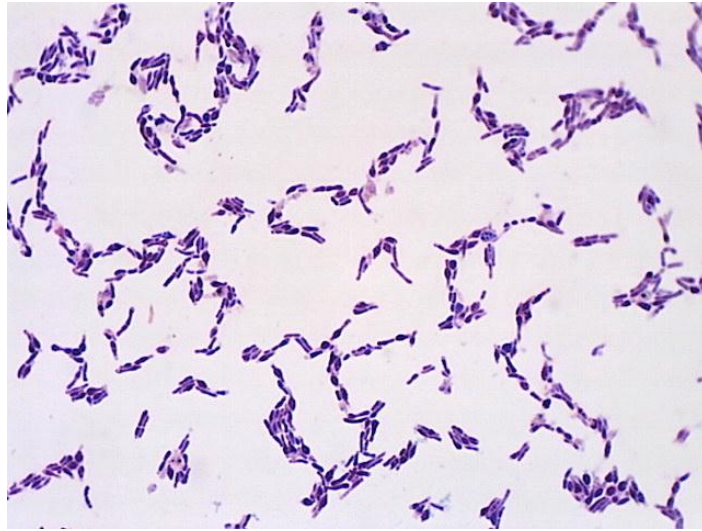
Divisi : Firmicutes

Class : Bacilli

Ordo : Lactobacillales

Family : Lactobacillaceae

Genus : *Lactobacillus*



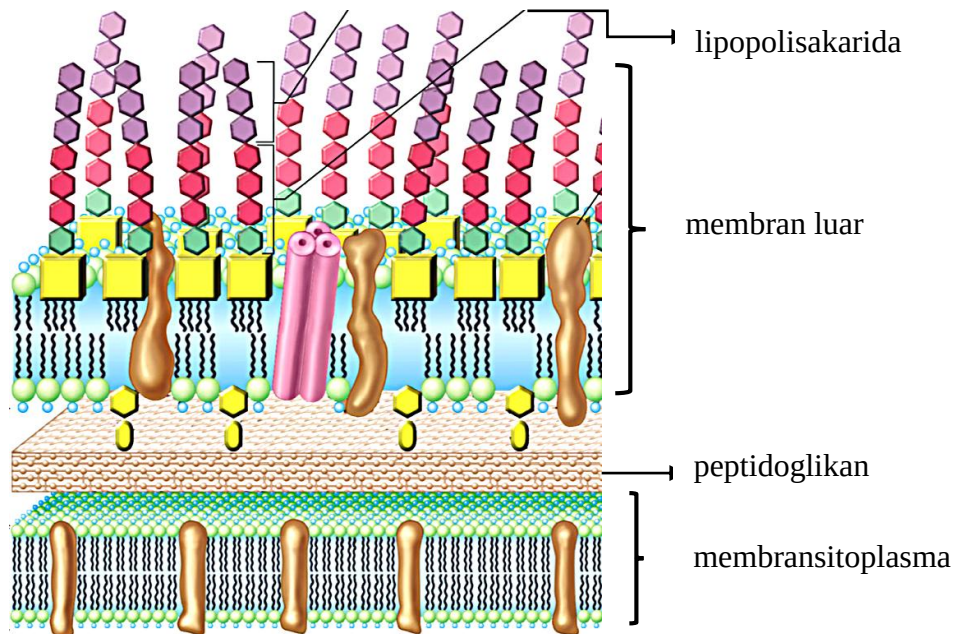
Gambar 2.4 *Lactobacillus* sp (JCM no. 1102)

Lactobacillus sp. hidup pada kondisi *microaerophilic* dengan adanya karbon dioksida dan pH yang asam (6,0) serta banyak terdapat di dalam rongga mulut dan bagian tubuh lainnya. Banyak penelitian menunjukkan prevalensi yang tinggi pada karies permukaan akar. Bakteri ini dianggap menjadi kandidat penyebab karies karena dijumpai jumlahnya yang tinggi pada kebanyakan lesi karies enamel. Korelasi positif antara jumlah *Lactobacillus* sp. di dalam plak dan saliva dengan aktivitas karies; kemampuan *Lactobacillus* sp. untuk mensintesa polisakarida baik ekstraseluler maupun intraseluler dari sukrosa; kemampuan beberapa spesies *Lactobacillus* sp. menyebabkan karies pada tikus *gnotobiotics* (bebas kuman). Kenyataan bahwa jumlah *Lactobacillus* sp. di dalam plak gigi yang diambil dari tempat yang sehat biasanya rendah. Walaupun peran *Lactobacillus* sp. pada proses karies belum dijelaskan dengan baik, dipercaya bahwa spesies ini terlibat lebih dalam pada proses lesi enamel yang dalam dan merupakan organisme pelopor dalam proses karies terutama pada dentin (Dwidjoseputro, 2005).

2.2.2 Bakteri Gram Negatif

Menurut (Amils, 2011), bakteri Gram negatif adalah [bakteri](#) yang mempertahankan [zat warna](#) merah sewaktu proses [pewarnaan Gram](#). Bakteri jenis ini akan berwarna merah atau merah muda di bawah pengamatan mikroskop. Sesuai Gambar 2.5, bakteri ini memiliki lapisan peptidoglikan tipis yang membedakannya dengan bakteri Gram positif. Tidak terdapat asam lipoteikhoik tapi memiliki lapisan

lipopolisakarida pembentuk membran luar. Beberapa contoh bakteri Gram negatif yakni *Eschericia Coli*, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Salmonella thypi*.



Gambar 2.5 Dinding sel bakteri Gram negatif secara umum (Silhavy dkk, 2010)

2.2.2.1 *Eschericia coli*

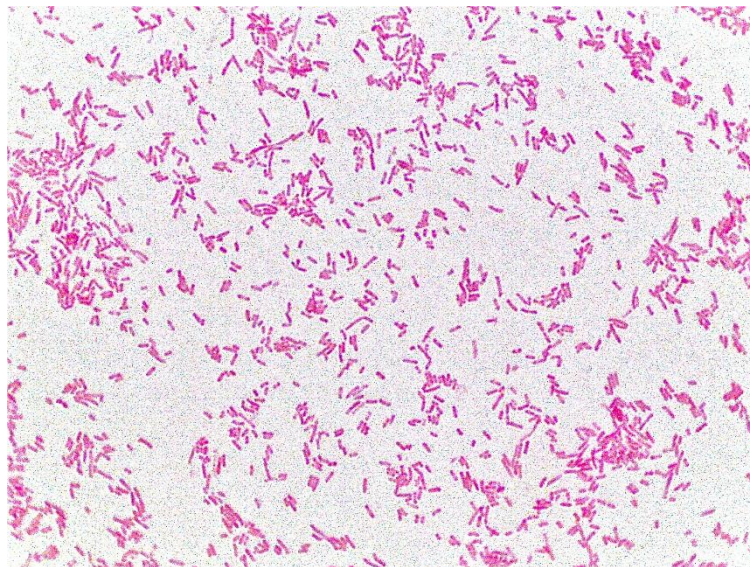
Bakteri *Escherichia coli* termasuk bakteri yang berbentuk batang, memiliki ukuran lebar $0,5\ \mu\text{m}$ - $1,0\ \mu\text{m}$ dan panjang $1,0\ \mu\text{m}$ - $3,0\ \mu\text{m}$. Terdapat dalam keadaan tunggal dan membentuk rantai pendek seperti yang terlihat pada Gambar 2.6. *Escherichia coli* termasuk bakteri mesofil, dapat hidup pada suhu 25°C - 40°C dan tumbuh secara optimum pada suhu 30°C - 37°C . Bakteri ini dapat berkembang dengan baik pada medium dengan pH 6-8 (Digwijaya, 2006).

Escherichia coli dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom : Bacteria
Divisio : Protobacteria
Kelas : Gamma Protobacteria
Ordo : Enterobacteriales
Family : Enterobacteriaceae
Genus : *Escherichia*
Spesies : *Escherichia coli*

Escherichia coli merupakan bakteri Gram negatif. Pada keadaan aerob menggunakan senyawa organik sebagai sumber energi, sedangkan pada keadaan anaerob energi diperoleh dari fermentasi karbohidrat (Beveridge dan Davies, 1983)

Secara normal *Escherichia coli* ada dalam usus besar manusia dan hewan berdarah panas, tetapi dapat bersifat patogen dengan menimbulkan bermacam-macam penyakit ekstra testinal dan imunitas intestium. *Escherichia coli* telah bertahun-tahun diduga sebagai penyebab diare pada manusia dan hewan, karena *Escherichia coli* menghasilkan enterotoksin yang secara tidak langsung menyebabkan kehilangan cairan atau inflasi lapisan epithelium dinding usus yang menyebabkan peradangan dan kehilangan cairan (Digwijaya, 2006).



Gambar 2.6 *Escherichia coli* (JCM no. 16575)

2.2.2.2 *Pseudomonas Aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa merupakan bakteri gram negatif, berbentuk batang lurus atau lengkung berukuran sekitar $0,6 \times 2 \mu\text{m}$, ditemukan tunggal, berpasangan, dan kadang-kadang membentuk rantai pendek seperti pada Gambar 2.7. Bakteri ini tidak memiliki spora, tidak mempunyai selubung (*sheath*), serta mempunyai flagel. Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* memiliki dua atau tiga flagel sehingga selalu bergerak.

Pseudomonas aeruginosa merupakan bakteri aerob yang dapat tumbuh dengan mudah pada banyak jenis media pembiakan, karena memiliki kebutuhan

nutrisi yang sangat sederhana. Koloni *Pseudomonas aeruginosa* mengeluarkan bau manis atau menyerupai anggur yang dihasilkan aminoasetafenon.

Pseudomonas aeruginosa memiliki klasifikasi sebagai berikut:

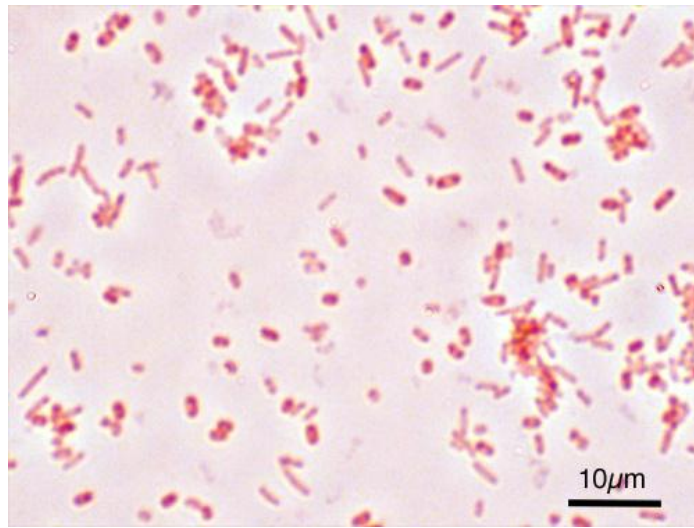
Divisi : Protophyta
Class : Schizomycetes
Ordo : Pseudomonadales
Subordo : Pseudomonadinae
Familia : Pseudomonadaceae
Genus : *Pseudomonas*
Spesies : *Pseudomonas aeruginosa*



Gambar 2.7 *Pseudomonas aeruginosa* (JCM no. 14847)

2.2.2.3 *Salmonella typhi*

Salmonella merupakan bakteri Gram negatif berbentuk batang bergerak yang khas seperti pada Gambar 2.8. Bakteri ini memfermentasikan glukosa dan manosa tanpa membentuk gas tetapi tidak memfermentasikan laktosa dan sukrosa. *Salmonella* menghasilkan H₂S (Jawetz dkk., 2006). Isolat salmonella pada media SSA pada suhu 37°C koloni maka akan tampak cembung, transparan, bercak hitam dibagian pusat. Bakteri salmonella akan mati pada suhu 60°C selama 15 – 20 menit melalui pasteurisasi, pendidihan dan khlorinasi (Nugraha, 2012)



Gambar 2.8 *Salmonella typhi* (JCM no. 1652)

Dari Jawetz dkk, 2006 , *Salmonella typhi* memiliki klasifikasi sebagai berikut :

Kingdom : Bacteria

Filum : Proteobacteria

Ordo : Gamma Proteobacteria

Class : Enterobacteriales

Family : Enterobacteriaceae

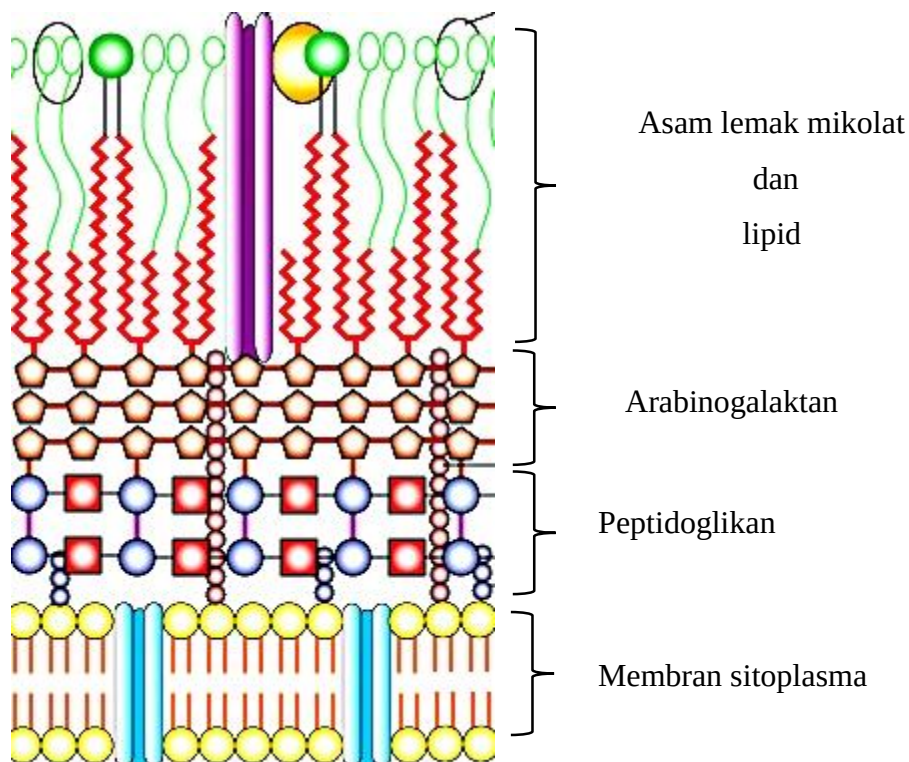
Genus : *Salmonella*

Spesies : *Salmonella typhi*

Salmonella typhi merupakan bakteri penyebab salmonellosis yang merupakan salah satu penyakit edemis dan menimbulkan kerugian yang serius terutama di Negara berkembang termasuk Indonesia. Bakteri salmonella ditularkan melalui makanan dan minuman yang terkontaminasi kotoran atau tinja dari seorang penderita tifoid. Bakteri masuk melalui mulut bersama makanan dan minuman, kemudian berlanjut kesaluran pencernaan. Jika bakteri yang masuk dengan jumlah yang banyak maka bakteri akan masuk ke dalam usus halus selanjutnya masuk ke dalam sistem peredaran darah sehingga menyebabkan bakterimia, demam tifoid, dan komplikasi organ lain (Wagner, 2014).

2.2.3 Bakteri Tahan Asam

Bakteri tahan asam (BTA) merupakan bakteri yang memiliki ciri-ciri yaitu berantai karbon (C) yang panjangnya 8 - 95 dan memiliki dinding sel yang tebal yang terdiri dari lapisan lilin dan asam lemak mikolat yang terlihat pada Gambar 2.9. Lipid yang ada bisa mencapai 60% dari berat dinding sel. Bakteri yang termasuk BTA antara lain *Helicobacter pylori*, *Rickettsia ricketti*, dan *Vibrio cholera*



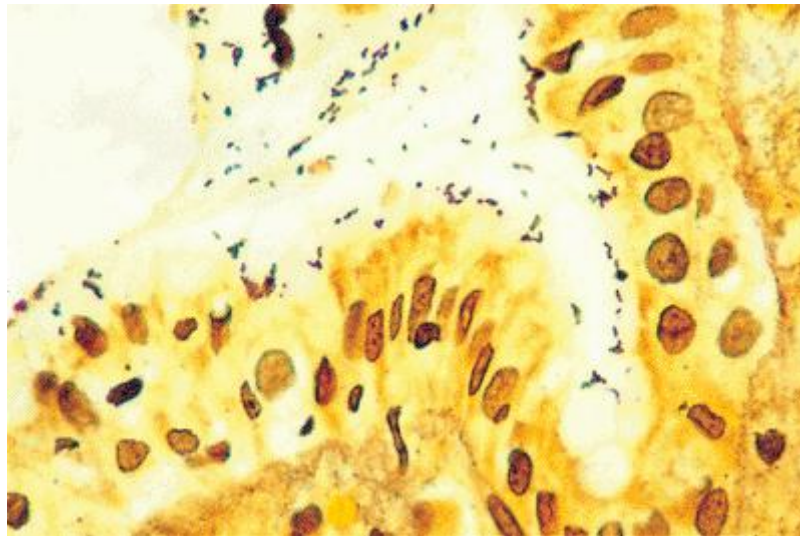
Gambar 2.9 Dinding sel bakteri tahan asam secara umum

2.2.3.1 *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori (H. Pylori) adalah golongan mikrobakteri dengan ukuran 0,6-1,5 mikro meter yang dapat hidup pada suhu 35°C- 37°C. Berdasarkan penyusun dinding selnya, bakteri ini tergolong bakteri Gram negatif, berbentuk batang bengkok seperti pada Gambar 2.10, tidak berspora, dan memiliki flagel. Bakteri ini juga mampu memproduksi enzim katalase, sitokrom, dan urea.

H. pylori adalah suatu [bakteri](#) yang menyebabkan peradangan lapisan [lambung](#) yang kronis pada manusia. Bakteri ini juga adalah [penyebab](#) yang paling umum dari borok-borok (ulcers) diseluruh dunia. Infeksi bakteri helicobacter

kemungkinan besar didapat dengan memakan makanan dan air yang tercemar serta melalui kontak orang ke orang (Kusters dkk, 2006).

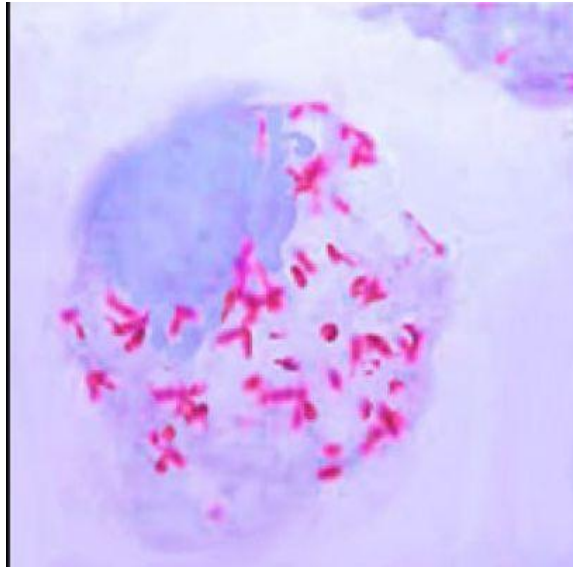


Gambar 2.10 *Helicobacter pylori* (JCM no. 12093)

2.2.3.2 *Rickettsia rickettsi*

Berdasarkan morfologi dinding selnya menunjukkan bahwa bakteri ini merupakan bakteri gram negatif berbentuk basil yang terlihat pada Gambar 2.11. *Rickettsia* merupakan genus organisme non-meotile, tidak memiliki bentuk spora, termasuk bakteri pleomorfik yang dapat berbentuk coccus (diameter 0,1 μm) maupun batang (diameter 1,4 μ). Bakteri ini memiliki membran luar dan lapisan muiren yang tipis. Muiren merupakan polimer yang ditemukan pada dinding sel dari organisme prokariotik. Lipoposakarida yang merupakan ciri bakteri gram negatif dapat ditemukan jelas pada membran luarnya.

Rickettsia adalah [genus bakteri gram-negatif](#). *Rickettsia* bersifat [parasit intraselular obligat](#), dan dapat menyebabkan [penyakit Rickettsia](#). Menjadi Parasit intra seluler obligat, kelangsungan hidup *Rickettsia* tergantung pada entri, pertumbuhan, dan replikasi dalam [sitoplasma](#) dari [eukariotik](#) sel inang (sel endotel biasanya). Metode perkembangan *Rickettsia* dalam embrio ayam ditemukan oleh [Ernest William Goodpasture](#) dan koleganya di [Universitas Vanderbilt](#) pada tahun 1930an.



Gambar 2.11 *Rickettsia rickettsii* (JCM no. 01723)

Kelangsungan hidup *Rickettsia* tergantung pada entri, pertumbuhan, dan replikasi dalam [sitoplasma](#) dari [eukariotik](#) sel inang (sel endotel biasanya). Karena itu, *Rickettsia* tidak dapat hidup dalam lingkungan nutrisi buatan dan tumbuh baik dalam [jaringan](#) (biasanya, embrio ayam yang digunakan) (Baron, 1996).

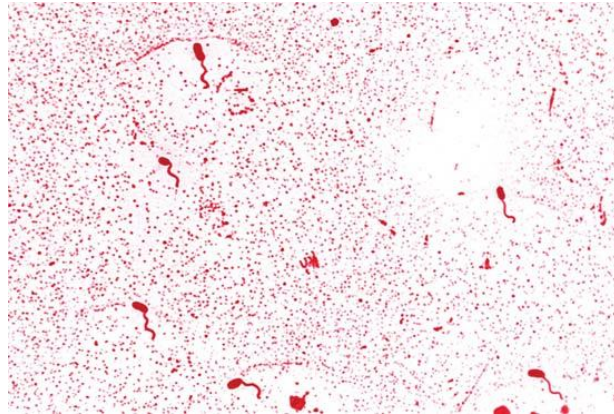
2.2.3.3 *Vibrio cholera*

Vibrio cholerae adalah salah satu bakteri yang masuk dalam family Vibrionaceae selain dari *Aeromonas* dan *Plesiomonas*, dan merupakan bagian dari genus *Vibrio*. *Vibrio cholerae* banyak ditemui di permukaan air yang terkontaminasi dengan feces yang mengandung kuman tersebut, oleh karena itu penularan penyakit kolera ini dapat melalui air, makanan dan sanitasi yang buruk.

Berikut klasifikasi bakteri *Vibrio cholera* adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Bacteria
Phylum	: Proteobacteria
Class	: GammaProteobacteria
Order	: Vibrionales
Family	: Vibrionaceae
Genus	: <i>Vibrio</i>
Spesies	: <i>Vibrio cholerae</i>

Bakteri ini merupakan bakteri gram negatif, berflagel polar, berbentuk batang seperti pada Gambar 2.12, dan bersifat anaerobik. Hanya membutuhkan zat-zat gizi yang sederhana dan tidak peka terhadap keadaan basa, dapat tumbuh pada pH 9,0-9,6. *Vibrio cholera* adalah patogen dalam usus, penyebab kolera yang ditandai oleh diare berair dan muntah-muntah secara tiba-tiba dan berulang-ulang. Pada keadaan yang gawat, cairan usus habis



Gambar 2.12 *Vibrio cholera* (JCM no. 14049)

Bakteri *Vibrio* yang merupakan etiologi dari penyakit kolera adalah bakteri gram negatif berbentuk batang bengkok seperti koma (*comma shaped*), Koch menamakannya “komma bacillus” tapi bila biakan diperpanjang, kuman ini bisa menjadi batang yang lurus. *V. cholerae* memiliki satu flagella polar yang halus (*monotrikh*) di salah satu kutubnya sehingga memiliki motilitas yang tinggi (Faruque dan Nair, 2008)

2.3 Pewarnaan Bakteri

Prinsip dasar dari pewarnaan ini adalah adanya ikatan ion antara komponen seluler dari bakteri dengan senyawa aktif dari pewarnaan yang disebut kromogen. Terjadi ikatan ion karena adanya muatan listrik baik pada komponen seluler maupun pada pewarnaan. Berdasarkan adanya muatan ini maka dapat dibedakan pewarna asam dan pewarna basa. Teknik Pewarnaan bukan pekerjaan yang sulit tapi perlu ketelitian dan kecermatan bekerja serta mengikuti aturan dasar yang berlaku (Lay, 1994)

2.3.1 Pewarnaan Sederhana

Pewarnaan sederhana merupakan teknik pewarnaan yang paling banyak digunakan. Disebut sederhana karena hanya menggunakan satu jenis zat warna untuk mewarnai organisme tersebut. Kebanyakan bakteri mudah bereaksi dengan pewarnaan-pewarnaan sederhana karena sitoplasmanya bersifat basofilik (suka dengan basa). Zat-zat warna yang digunakan untuk pewarnaan sederhana umumnya bersifat alkalin. Dengan pewarnaan sederhana dapat mengetahui bentuk dan rangkaian sel-sel bakteri. Pewarna basa yang biasa digunakan untuk pewarnaan sederhana ialah metilen biru, kristal violet, dan karbol fuchsin yang mana pewarnaan sederhana ini dibagi lagi menjadi dua jenis pewarnaan.

2.3.2 Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram atau metode Gram adalah suatu metode empiris untuk membedakan spesies bakteri menjadi dua kelompok besar, yakni gram positif dan gram negatif, berdasarkan sifat kimia dan fisik dinding sel mereka. Metode ini diberi nama berdasarkan penemunya, ilmuwan Denmark Hans Christian Gram (1853–1938) yang mengembangkan teknik ini pada tahun 1884 untuk membedakan antara pneumokokus dan bakteri *Klebsiella pneumoniae*. Bakteri Gram-negatif adalah bakteri yang tidak mempertahankan zat warna metil ungu pada metode pewarnaan Gram. Bakteri gram positif akan mempertahankan zat warna metil ungu gelap setelah dicuci dengan alkohol, sementara bakteri gram negatif tidak. Pada uji pewarnaan Gram, suatu pewarna penimbal (counterstain) ditambahkan setelah metil ungu, yang membuat semua bakteri gram negatif menjadi berwarna merah atau merah muda. Pengujian ini berguna untuk mengklasifikasikan kedua tipe bakteri ini berdasarkan perbedaan struktur dinding sel mereka (Aditya, 2010)

2.3.3 Pewarnaan Tahan Asam

Pewarnaan tahan asam yang umum digunakan adalah pewarnaan Ziehl – Neelson dengan pewarna utama karbol fuksin dengan pemanasan dan pewarna tandingan metilen blue Loeffler. Perlakuan panas tersebut diganti dengan penggunaan pembasah yaitu suatu deterjen untuk mengurangi tegangan permukaan lemak, untuk menjamin penetrasi. Pewarna yang mengandung pembasah ini disebut pewarna Kinyoun (Purwoko, 2010).

Sekali sitoplasma terwarnai, maka sel-sel organisme seperti mikobakteri menahan zat warna tersebut dengan erat, artinya tidak terpuaskan sekalipun oleh zat yang bersifat keras seperti asam alkohol (yaitu 3% HCL dalam etanol 95%). Alkohol asam ini merupakan pemucat yang sangat intensif dan jangan dikelirukan dengan alkohol-aseton yang banyak digunakan dalam prosedur pewarnaan Gram. Kondisi pewarnaan ini, organisme yang dapat menahan zat warna itu dikatakan tahan asam dan tampak merah. Bakteri biasa yang dindingnya tidak bersifat terlampaui lipoidal, pewarna karbol fuksin yang mewarnai sel dapat dengan mudah dipuaskan oleh alkohol-asam dan karenanya dikatakan tak tahan asam. Tercucinya karbol fuksin dapat diperagakan oleh terserapnya pewarna tandingan biru metilen oleh sel, sehingga bakteri tersebut tampak biru (Hadioetomo, 1993).

2.4 Tumbuhan Johar (*Senna siamea* Lam)

2.4.1 Klasifikasi Tanaman Johar

Johar merupakan pohon tahunan cepat tumbuh, dengan tinggi 10 hingga 20 meter. Batangnya bulat, egak, berkayu, dengan kulit kasar, bercabang, dan berwarna putih kotor. Daunnya majemuk dan berwarna hijau. Pertulangan daunnya menyirip genap dan mempunyai anak daun berbentuk bulat panjang. Ujung dan pangkal daunnya membulat, bertepi rata, dengan panjang daun 3-7,5 cm, dan lebar daun 1-2,5 cm. Bunganya majemuk, berwarna kuning, terletak di ujung batang serta kelopak bunganya berbagi lima, berwarna hijau kekuningan, dengan benang sari ± 1 cm, dan tangkai sari berwarna kuning, kepala sari berwarna coklat, putik berwarna hijau kekuningan. Bunganya mempunyai daun pelindung yang cepat rontok dan berwarna kuning. Mahkotanya lepas, berbentuk bulat telur dan berwarna kuning. Buah berupa polong, pipih, berbelah dua dengan panjang 15-20 cm dan lebar $\pm 1,5$ cm. Saat masih muda berwarna hijau dan setelah tua berwarna hitam seperti pada Gambar 2.13 dan berikut klasifikasi tanaman johar

Kerajaan : Plantae

Divisi : Magnoliophyta

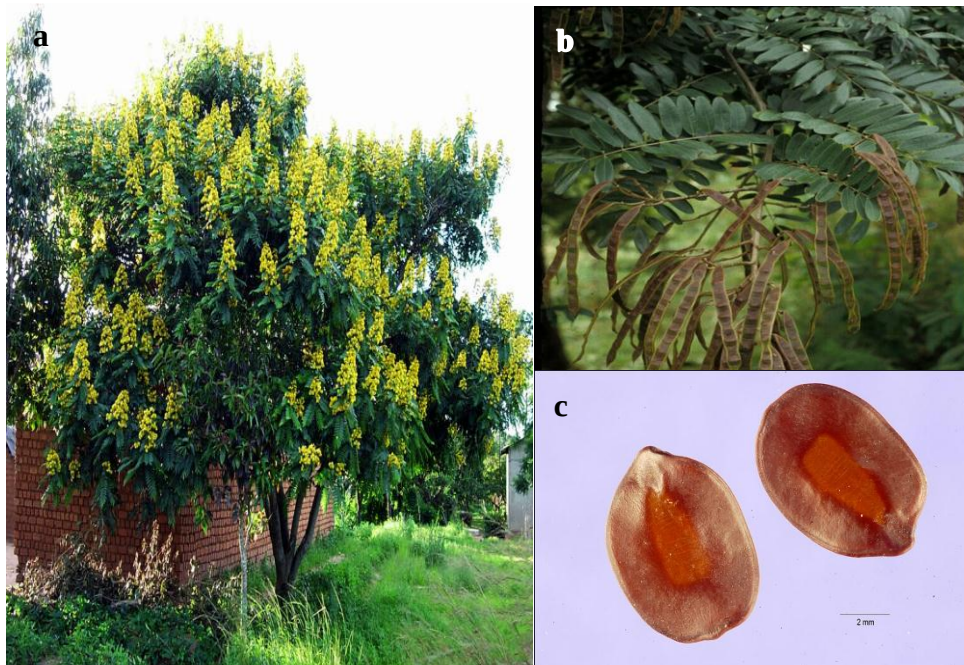
Kelas : Dycotiledonae

Ordo : Fabales

Keluarga : Fabaceae

Genus : Cassea

Jenis : Cassea siamea



Gambar 2.13 Tanaman Johar a)pohon, b) buah, dan c) biji

2.4.2 Minyak Biji Johar

Produk minyak kasar maupun minyak murni dari biji johar 90% berasal dari Nigeria. Minyak ini digunakan sebagai bahan bakar, pelumas dan antimikroba (Egwu dkk, 2015). Kandungan pengotor pada minyak biji johar kasar tergantung dari tipe minyak, tipe tanaman, dan level minyak (Agbogidi dan Egbuchua, 2010). Minyak biji johar mengandung asam linoleat, stigmasterol dan β -sitosterol yang tinggi.

Tabel 2-1 Sifat fisika minyak biji johar

No	Sifat Fisika	Minyak Cassia Siamea
1	Densitas (25°C)	1,055 s.d. 1,070
2	Index Refraksi (25°C)	1,6000 s.d.1,6060
3	Rotasi Optik	1 s.d. 6
4	Viskositas (cp)	0,27

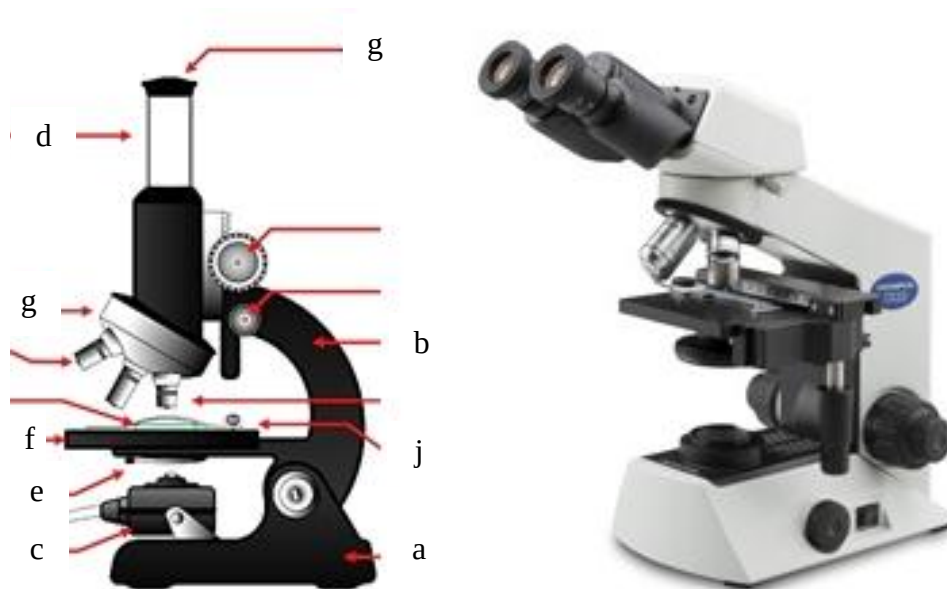
Sumber : Daulatabad dkk , 1988

2.5 Mikroskop

Mikroskop merupakan salah satu alat yang penting pada kegiatan laboratorium sains, khususnya biologi. Mikroskop merupakan alat bantu yang memungkinkan kita dapat mengamati obyek yang berukuran sangat kecil (mikroskopis). Hal ini membantu memecahkan persoalan manusia tentang organisme yang berukuran kecil. Untuk mengetahui mikroskop maka perlu diketahui komponen mikroskop, macam mikroskop, penggunaan dan pemeliharaannya.

2.5.1 Komponen mikroskop

Komponen mikroskop dapat kita lihat pada Gambar 2.14 sebagai berikut:



Gambar 2.14 Gambar alat mikroskop

- Kaki berfungsi menopang dan memperkokoh kedudukan mikroskop. Pada kaki melekat lengan dengan semacam engsel, pada mikroskop sederhana (model student)
- Lengan dipergunakan juga untuk memegang mikroskop pada saat memindah mikroskop. Dengan adanya engsel antara kaki dan lengan, maka lengan dapat ditegakkan atau direbahkan.
- Cermin mempunyai dua sisi, sisi cermin datar dan sisi cermin cekung, berfungsi untuk memantulkan sinar dan sumber sinar. Cermin datar digunakan bila sumber sinar cukup terang, dan cermin cekung digunakan

bila sumber sinar kurang. Cermin dapat lepas dan diganti dengan sumber sinar dari lampu. Pada mikroskop model baru, sudah tidak lagi dipasang cermin, karena sudah ada sumber cahaya yang terpasang pada bagian bawah (kaki).

- d. Kondensor tersusun dari lensa gabungan yang berfungsi mengumpulkan sinar.
- e. Diafragma berfungsi mengatur banyaknya sinar yang masuk dengan mengatur bukaan iris. Letak diafragma melekat pada diafragma di bagian bawah. Pada mikroskop sederhana hanya ada diafragma tanpa kondensor.
- f. Meja preparat merupakan tempat meletakkan objek (preparat) yang akan dilihat. Objek diletakkan di meja dengan dijepit dengan oleh penjepit. Dibagian tengah meja terdapat lengan untuk dilewat sinar. Pada jenis mikroskop tertentu, kedudukan mejatidak dapat dinaik atau diturunkan. Pada beberapa mikroskop, terutama model terbaru, meja preparat dapat dinaik-turunkan.
- g. Di bagian atas tabung melekat lensa okuler, dengan perbesaran tertentu (15X, 10X, dan 15 X). Dibagian bawah tabung terdapat alat yang disebut revolver. Pada revolver tersebut terdapat lensa objektif.
- h. Lensa objektif bekerja dalam pembentukan bayangan pertama. Lensa ini menentukan struktur dan bagian renik yang akan terlihat pada bayangan akhir. Ciri penting lensa obyektif adalah memperbesar bayangan obyek dengan perbesaran beraneka macam sesuai dengan model dan pabrik pembuatnya, misalnya 10X, 40X, dan 100X dan mempunyai nilai apertura (NA). Nilai apertura adalah ukuran daya pisah suatu lensa obyektif yang akan menentukan daya pisah spesimen, sehingga mampu menunjukkan struktur renik yang berdekatan sebagai dua benda yang terpisah.
- i. Lensa mikroskop yang terdapat di bagian ujung atas tabung, berdekatan dengan mata pengamat. Lensa ini berfungsi untuk memperbesar bayangan yang dihasilkan oleh lensa obyektif. Perbesaran bayangan yang terbentuk berkisar antara 4 - 25 kali.
- j. Kontroler. komponen ini letaknya pada bagian lengan dan berfungsi untuk mengatur kedudukan lensa objektif terhadap objek yang akan dilihat. Pada

mikroskop dengan tabung lurus/tegak, pengatur kasar dan halus untuk menaikturunkan tabung sekaligus lensa objektif. Pada mikroskop dengan tabung miring, pengatur kasar dan halus untuk menaikturunkan meja preparat.

2.5.2 Macam-macam mikroskop

Ada dua jenis mikroskop berdasarkan pada kenampakan obyek yang diamati, yaitu mikroskop dua dimensi (mikroskop cahaya) dan mikroskop tiga dimensi (mikroskop stereo). Sedangkan berdasarkan sumber cahayanya, mikroskop dibedakan menjadi mikroskop cahaya dan mikroskop elektron. Mikroskop yang umum digunakan untuk pewarnaan bakteri adalah mikroskop cahaya.

Mikroskop cahaya mempunyai perbesaran maksimum 1000 kali. Mikroskop mempunyaikaki yang berat dan kokoh dengan tujuan agar dapat berdiri dengan stabil. Mikroskop cahaya memiliki tiga sistem lensa, yaitu lensa obyektif, lensa okuler, dan kondensor. Lensa obyektif dan lensa okuler terletak pada kedua ujung tabung mikroskop. Lensa okuler pada mikroskop bisa berbentuk lensa tunggal (monokuler) atau ganda (binokuler). Pada ujung bawah mikroskop terdapat tempat duduk lensa obyektif yang bisa dipasangi tiga lensa atau lebih. Di bawah tabung mikroskop terdapat meja mikroskop yang merupakan tempat preparat. Sistem lensa yang ketiga adalah kondensor. Kondensor berperan untuk menerangi obyek dan lensa-lensa mikroskop yang lain.

“Halaman ini sengaja dikosongkan

BAB 3

METODA PENELITIAN

Pada penelitian ini, akan dilakukan pewarnaan terhadap tiga kelompok bakteri berdasarkan struktur membrannya, yakni bakteri Gram positif, bakteri Gram negatif dan bakteri tahan asam. Dari tiga kelompok bakteri tersebut akan diambil 3 contoh bakteri untuk masing diwarnai dengan minyak biji johan dan pewarna Gram untuk kemudian dibandingkan dibawah pengamatan mikroskop cahaya.

Minyak biji johan sebagai zat pewarna diperoleh dengan cara ekstraksi dan pemurnian biji tanaman johan. Metode yang digunakan untuk mengekstrak minyak johan adalah metode Solvent Extraction (metode ekstraksi dengan pelarut) dan pemurniannya menggunakan metode degumisasi, pemucatan, netralisasi, dan winterisasi.

Minyak johan kemudian diukur indeks bias, viskositas, bilangan asam, bilangan dispersi dan bilangan peroksidanya kemudian dikarakterisasi gugus fungsinya dengan bantuan instrumentasi FTIR dan bilangan dispersi dengan bantuan instrumentasi spektroskopi UV-Vis.

1.1 Alat dan Bahan

1.1.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain peralatan gelas, penggiling, *hotplate*, pengaduk magnet, batang pengaduk, tongkat ose, dan termometer. Instrumen yang digunakan antara lain refraktometer Abbe untuk mengukur indeks bias, viscometer Ostwald untuk mengukur viskositas, spektroskopi UV-Vis untuk mengukur bilangan dispersi, *Fourier Transform Infra Red (FTIR)* untuk karakterisasi gugus fungsi, spektroskopi UV-Vis untuk serapan cahaya, dan mikroskop cahaya untuk visualisasi bakteri.

1.1.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bahan utama penghasil minyak yakni biji johan serta bahan-bahan kimia yang memiliki kemurnian pro analisis (p.a) meliputi n-heksan (C_6H_{14}) , asam fosfat (H_3PO_4),

85%, NaOH, hydrogen peroksida (H_2O_2) 40%, asam asetat glacial, kloroform, kalium iodide (KI) jenuh, Natrium tiosulfat (Na_2SO_3) 0,1 N, Natrium Karbonat, Etanol 70%, indikator phenolphthalein, Kalium hidroksida (KOH), dan NaCl, Bleaching earth, arang aktif, pewarna kristal violet, pewarna mordan dan pewarna safranin.

1.2 Prosedur Kerja

1.2.1 Pembuatan Minyak Biji Johar

1.2.1.1 Ekstraksi Minyak

Biji johan dicuci bersih, dikeringkan, dan digiling halus kemudian ditimbang sebanyak 100 gram. Biji johan yang telah ditimbang kemudian dimasukkan kedalam kantong yang terbuat dari kertas saring kemudian di ekstraksi dengan 500 mL pelarut n-heksan. Kemudian di panaskan hingga pelarut dalam sirkulator berwarna bening. Ekstrak yang dihasilkan kemudian diuapkan pelarutnya dalam evaporator hingga yang tersisa hanya ekstrak minyak dalam labu evaporator.

1.2.1.2 Pemurnian Minyak

Memurnikan minyak kasar untuk memperoleh minyak immersi yang mengacu pada Standar Nasional Indonesia Refined bleached deodorized oil (SNI 01-0014-1987) meliputi empat tahap yakni degumisasi, pemucatan, netralisasi, dan winterisasi.

a. Tahap penghilangan gum

Asam fosfat 85% didispersikan sebanyak 0,05 s.d. 1,2% dari jumlah minyak pada suhu 80 °C hingga 100 °C. Ditambahkan bleaching earth sebanyak 3% dari jumlah minyak pada kondisi vakum dan dipanaskan hingga suhu 120-140 °C, kemudian disaring dalam keadaan panas hingga memperoleh filtrat.

b. Tahap pemucatan

Minyak dipanaskan hingga suhu 70°-80°C kemudian ditambahkan arang aktif sebanyak 1,0% dari berat minyak. Minyak dipanaskan lebih lanjut hingga suhu 105 °C selama satu jam. Kemudian disaring dalam keadaan panas hingga diperoleh filtrat.

c. Tahap netralisasi

Minyak dipanaskan pada suhu 35-40 °C, kemudian ditambahkan larutan natrium karbonat, kemudian diaduk selama 10-15 menit dengan kecepatan pengadukan 65-75 rpm. Sabun yang terbentuk diendapkan dengan menambahkan natrium sulfat dan dicuci dengan air panas.

d. Tahap winterisasi

Minyak didinginkan secara perlahan hingga suhu 6 °C selama 24 jam hingga terbentuk kristal kemudian didiamkan selama 6 jam pada suhu kamar lalu disaring untuk memperoleh filtrat.

1.2.2 Karakterisasi Minyak Johar

1.2.2.1 Penentuan gugus fungsi minyak

Minyak johar hasil ekstraksi dan pemurnian dikarakterisasi gugus fungsinya dengan menggunakan *Fourier Transform Infra Red* (FTIR). Sebelum dilakukan karakterisasi FTIR, minyak dihomogenkan terlebih dahulu. Minyak ditetaskan pada sel KBr dan diberi pembatas politetraflouroetilen (PTFE) pada kedua sel KBr untuk menghasilkan ketebalan kurang dari 0,1 mm. Bagian sel lainnya ditangkupkan hingga terbentuk lapisan tipis minyak. Kemudian dilakukan scanning dengan kisaran panjang gelombang 4000 cm^{-1} sampai dengan 650 cm^{-1} dengan resolusi 4 cm^{-1} rekam hasil.

1.2.2.2 Pengukuran indeks bias

Minyak immersi ditetaskan sebanyak tiga tetes di atas prisma *Refractometer Abbe* pada suhu kamar kemudian diukur indeks biasnya.

1.2.2.3 Pengukuran viskositas

Minyak immersi dimasukkan ke dalam *viscometer Ostwald*, kemudian diukur laju alir minyak dari tanda A ke tanda B pada alat tersebut untuk diukur viskositasnya.

1.2.2.4 Pengukuran panjang gelombang maksimum

Minyak johar diukur bilangan serapannya menggunakan spektroskopi UV-VIS yakni menentukan panjang gelombang yang sesuai terlebih dahulu kemudian mengukur absorbansinya.

1.2.2.5 Penentuan bilangan asam

Minyak johar ditimbang sebanyak 10 gram kemudian ditambahkan 50 mL alcohol netral 95% kemudian dipanaskan selama 10 menit dalam penangas air sambil diaduk. Larutan kemudian dititrasi dengan KOH 0,1 N dengan indictor Penolphthalein 1% dalam alcohol hingga terlihat warna merah muda. Setelah itu dihitung jumlah milligram KOH yang digunakan untuk menetralkan asam lemak bebas dalam 1 gram minyak (Jacobs, 1958)

1.2.2.6 Penentuan bilangan peroksida

Penentuan bilangan peroksida mengacu pada standar Association of Official Analytical Chemist (AOAC) No. 965.33. Minyak ditimbang sebanyak 0,5 gram kemudian ditambahkan 30 mL campuran pelarut asam asetat glacial dan kloroform (2:3). Setelah minyak larut kemudian ditambahkan 0,5 mL Kalium Iodida jenuh lalu di aduk dan ditambahkan 30 mL air bebas alkali. Kelebihan iod dititrasi dengan natrium tiosulfat 0,1 N.

1.2.3 Pewarnaan Bakteri

Bakteri yang digunakan untuk diwarnai adalah bakteri gram positif, bakteri gram negatif dan bakteri tahan asam. Bakteri gram positif yang diamati yakni *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* dan *Lactobacillus sp.* Bakteri Gram negatif yang diamati yakni *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Bakteri tahan asam yakni *Helicobacter pylori*, *Rickettsia rickettsii* dan *Vibrio cholera*. Semua bakteri tersebut masing-masing disuspensikan terlebih dahulu sebelum disapukan.

1.2.3.1 Pewarnaan Gram

Gelas objek dan gelas penutup dibersihkan dengan alkohol 70% kemudian ditetesi dengan aquades steril. Kemudian dibuat apusan dari biakan miring dan disuspensikan sampel sampai homogen, lalu difiksasi di atas api bunsen. Apusan bakteri digenangi dengan pewarna kristal violet lalu preparat dipanaskan di atas penangas air mendidih sampai muncul uap air (10 menit) dan dijaga jangan sampai pewarna kering. Kemudian dicuci dengan air mengalir, dikeringanginkan, diwarnai dengan safranin (1-2 menit) lalu dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan lagi. Kemudian diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000x.

1.2.3.2 Pewarnaan Minyak Johar

Gelas objek dan gelas penutup dibersihkan dengan alkohol 70% kemudian ditetesi dengan aquades steril. Kemudian dibuat apusan dari biakan miring dan disuspensikan sampel sampai homogen, lalu difiksasi di atas api bunsen. Apusan bakteri ditetesi dengan minyak johar hingga menggenang. Kemudian diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000x.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada bagian hasil dan pembahasan dijelaskan mengenai ekstraksi minyak johar beserta karakterisasinya. Minyak johar yang telah dikarakterisasi digunakan untuk mewarnai bakteri dan kemudian dibandingkan dengan pewarnaan standar bakteri yakni pewarnaan Gram dibawah pengamatan mikroskop

1.3 Ekstraksi Minyak Jarak

Penelitian ini diawali dengan mencuci bersih dan mengeringkan biji jarak untuk menghilangkan kotoran dan mengurangi kadar air yang terkandung dalam biji. Biji jarak kemudian dihaluskan untuk memaksimalkan proses ekstraksi yang disebabkan bertambahnya luas permukaan yang berinteraksi dengan pelarut. Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi minyak adalah n-Heksana. Pelarut n-Heksana memiliki titik didih yang rendah yakni 67°C dan kelarutan tinggi terhadap minyak dan lemak sehingga sangat sesuai dimanfaatkan untuk ekstraksi (Gunstone, 2002). Minyak yang diperoleh berwarna gelap, berbau tengik dan keruh seperti pada Gambar 4.1. Minyak yang diperoleh kemudian dimurnikan dengan tujuan menghilangkan getah, bau yang tidak sedap, dan memperpanjang masa penyimpanan (Ketaren, 1986).

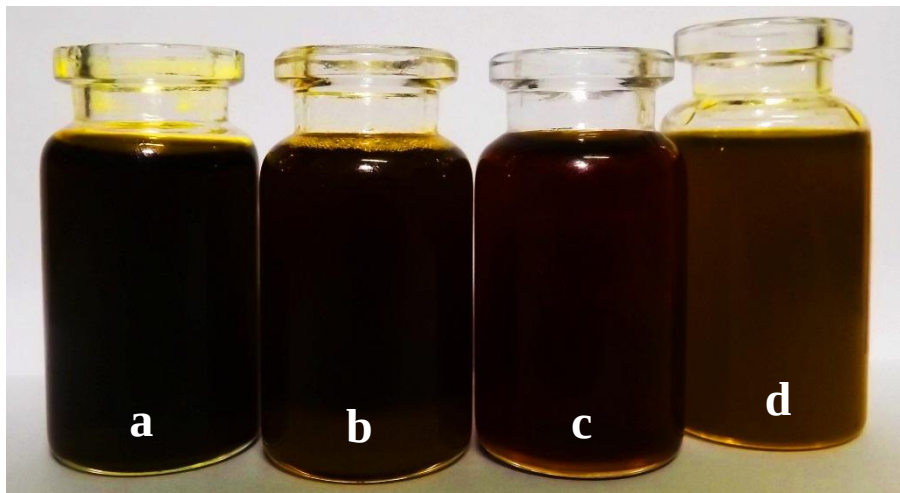


Gambar **Error! No text of specified style in document..1** Minyak biji johar hasil ekstraksi

Tahap pertama pemurnian minyak adalah tahap penghilangan getah (*degumming*). Menurut AOCS tahun 2011, minyak yang diperoleh dari hasil ekstraksi mengandung fosfatida yang berupa getah atau lendir. Kandungan getah pada minyak dapat menyebabkan minyak berwarna gelap. Getah ini dipisahkan dari minyak dengan penambahan asam fosfat pada suhu tinggi (90°C) sesuai dengan reaksi pada gambar 4.2, lalu kemudian disaring hingga diperoleh minyak bebas getah seperti gambar 4.3 a).



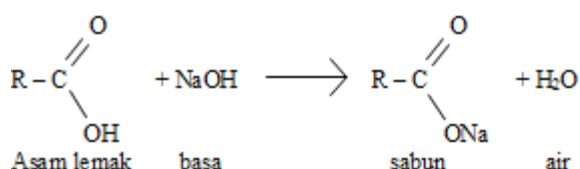
Gambar **Error! No text of specified style in document..2** Reaksi fosfatida dengan asam fosfat



Gambar **Error! No text of specified style in document..3** Minyak hasil pemurnian a) penghilangan getah, b) pemucatan, c) netralisasi, d) winterisasi

Tahap selanjutnya adalah penambahan tanah pemucat (*bleaching earth*) sebagai adsorben untuk menghilangkan zat berwarna pekat, pengotor dan menghilangkan kadar air yang tersisa dalam minyak. Tanah pemucat ini memiliki komposisi yang terdiri dari SiO_2 , Al_2O_3 , ion magnesium oksida dan besi oksida (Andersen, 1962). Keberadaan ion Al^{3+} pada permukaan partikel tanah pemucat dapat mengadsorbsi zat warna pekat dan partikel koloid serta mengikat air yang terdapat pada minyak (A, 1957). Minyak yang telah dipucatkan akan berwarna lebih terang dan terlihat lebih jernih sesuai Gambar 4.2 b).

Menurut (Sutheimer et al., 2015) untuk mengurangi kandungan asam lemak bebas penyebab ketengikan pada minyak, maka dilakukan tahap netralisasi. Pada proses netralisasi, ditambahkan natrium hidoksida (NaOH) untuk bereaksi dengan asam lemak bebas membentuk sabun sesuai mekanisme reaksi pada Gambar 4.4 hingga dihasilkan minyak seperti pada Gambar 4.3 c)

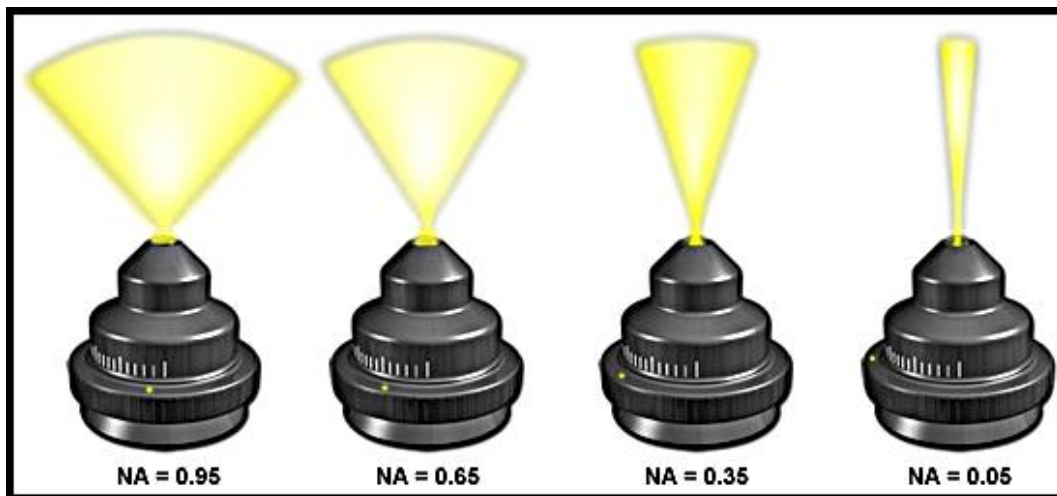


Gambar **Error! No text of specified style in document.**4 Reaksi penyabunan

Pada tahap akhir pemurnin, dilakukan pemisahan lemak yang terkandung dalam minyak melalui proses winterisasi. Lemak merupakan lipid yang ikut terekstrak kedalam minyak. Lemak memiliki titik yang cair tinggi, sehingga pada proses winterisasi, lemak akan segera membentuk padatan sehingga dapat dipisahkan dengan mudah dari minyak. Minyak hasil winterisasi nampak lebih jernih seperti pada Gambar 4.2 d)

1.4 Karakterisasi Minyak Biji Johar

Sesuai dengan Tabel 4.1, minyak jarak memiliki indeks bias yang lebih tinggi dibandingkan dengan indeks bias udara (> 1). Indeks bias yang tinggi dapat meningkatkan nilai *Numerical Apature* mengurangi pembiasan cahaya sehingga lebih fokus seperti pada Gambar 4.5



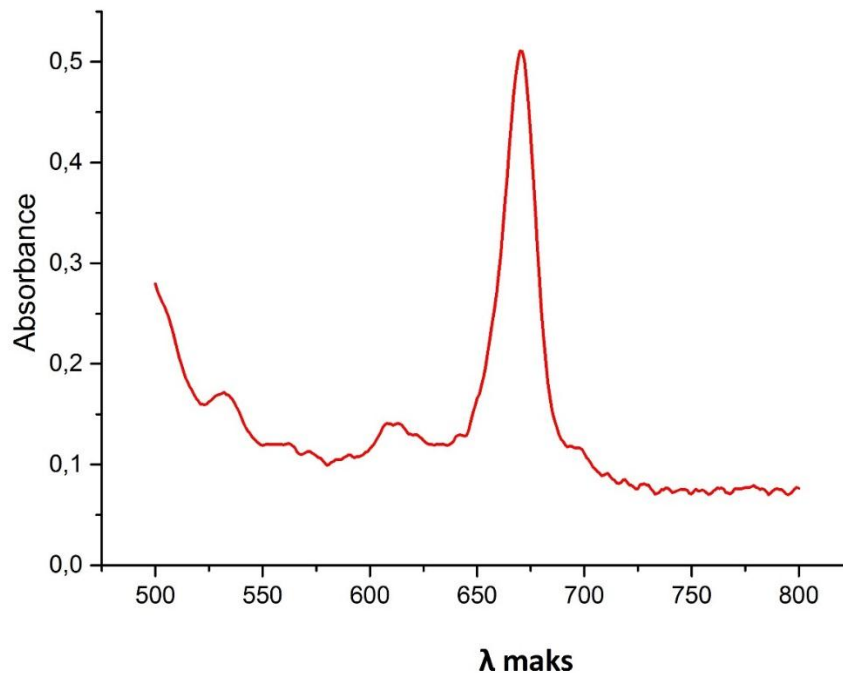
Gambar **Error! No text of specified style in document..5** Fokus cahaya berdasarkan peningkatan NA (Zeiss Microscopy)

Aplikasi minyak biji johar sebagai minyak immersi sangat sesuai dengan sifat fisika-kimia pada Tabel 4.1. Minyak ini memiliki viskositas yang tinggi (>20-40 cp) sehingga tidak mudah mengalir. Hal ini juga didukung oleh bilangan asam yang terkandung didalamnya. Bilangan asam dengan jumlah lebih dari 1% dari berat minyak mampu membentuk lapisan tipis, sebab asam lemak bebas dengan konsentrasi tersebut dapat bergabung dengan lemak netral (Ketaren, 1986).

Tabel **Error! No text of specified style in document..1** Sifat fisika-kimia minyak biji jarak

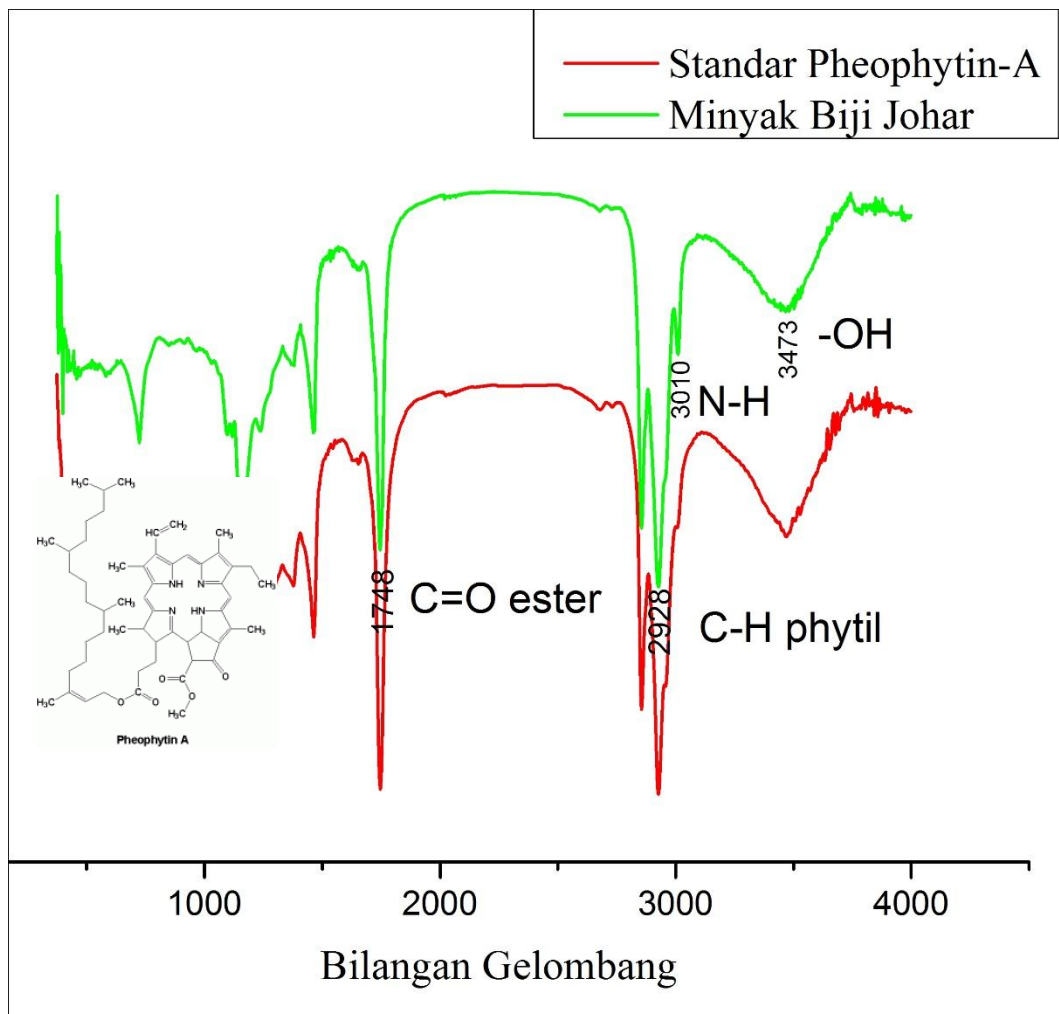
No	Parameter	Bilangan
1	Berat Jenis (g/mL)	0,8
2	Indeks bias	1, 44
3	Viskositas (cp)	44,9
4	Bilangan asam (mg KOH/g minyak)	16,66
5	Bilangan peroksida (mg O ₂ / 1000 g minyak)	5,54

Berdasarkan penentuan bilangan peroksida dan bilangan asam, minyak biji johan ini termasuk kedalam minyak yang tidak dapat bertahan lama sebab bilangan peroksida lebih tinggi dari SNI 01-3741-1995 (1 mg O₂/1000 g minyak). Oleh sebab itu, pada proses penyimpanan memerlukan perlakuan khusus untuk mencegah peristiwa oksidasi penyebab rusaknya minyak.



Gambar **Error! No text of specified style in document..6** Spektra UV-VIS minyak biji johan

Untuk penentuan karakter warna minyak biji johan, maka dilakukan analisis menggunakan spektrometer UV-Visible dan FTIR. Panjang gelombang maksimum yang diperoleh yakni 670 nm seperti pada Gambar 4.6. yang menyerupai pigmen pheophytin-A dan didukung lagi menggunakan FTIR dimana muncul puncak C=O ester di 1741 cm⁻¹, C-H phytol di 2928, N-H di 3010 cm⁻¹ dan puncak lebar -OH di 3473 cm⁻¹ seperti pada Gambar 4.7 yang merupakan puncak khas dari pheophytin-A (Parker, 2012).



Gambar **Error! No text of specified style in document..7** FTIR pheopitin dengan minyak johar

1.5 Hasil Uji Pengamatan dengan Mikroskop

Dilakukan visualisasi terhadap bakteri tanpa pewarnaan, dengan pewarnaan Gram dan dengan menggunakan minyak biji johar yang diamati dengan mikroskop. Tujuan visualisasi ini untuk melihat pengaruh pemberian minyak biji johar terhadap visualisasi bakteri untuk kemudian dibandingkan dengan tanpa pewarnaan dan pewarnaan Gram yang telah menjadi standar identifikasi bakteri.

1.5.1 Bakteri Gram Positif

Hasil pewarnaan pada bakteri Gram positif ditunjukkan pada Gambar 4.6 untuk bakteri *Bacillus subtilis*, Gambar 4.7 untuk bakteri *Staphylococcus aureus*

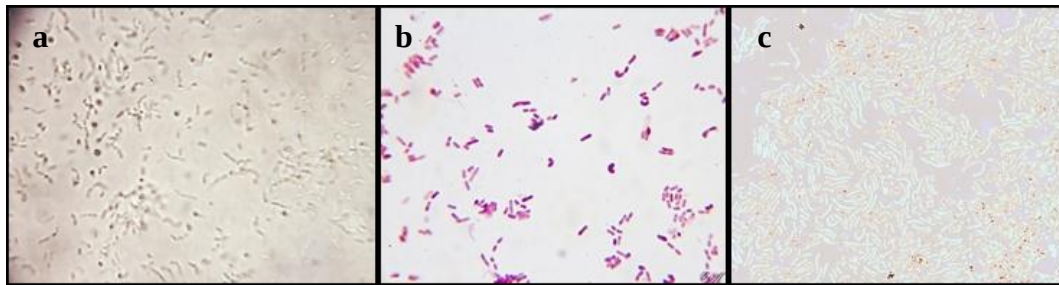
dan Gambar 4.8 untuk bakteri *Lactobacillus sp.* Ketiga Gambar tersebut menunjukkan bahwa morfologi dari ketiga bakteri tersebut tidak nampak jika tanpa pewarnaan dan menggunakan minyak biji johan. Hal ini disebabkan karena dinding sel bakteri gram positif seperti bakteri *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* dan *Lactobacillus sp* sebagian besar terdiri atas beberapa lapisan peptidoglikan yang membentuk suatu struktur yang tebal dan kaku. Kekakuan pada dinding sel bakteri yang disebabkan karena lapisan peptidoglikan dan ketebalan peptidoglikan ini membuat dinding sel bakteri Gram positif bersifat polar (Dewi, 2010) serta resisten terhadap lisis osmotik.(Jewetz dkk,2001). Oleh sebab itu, maka minyak biji johan yang bersifat non polar tidak mampu menembus dinding sel bakteri. Sedangkan penggunaan pewarnaan Gram dapat menampilkan visualisasi ketiga bakteri tersebut dengan jelas sebab kristal violet yang digunakan bersifat polar dan mampu melekat pada dinding sel bakteri.



Gambar **Error! No text of specified style in document..8** *Bacillus subtilis* a) tanpa pewarna B) Pewarnaan Gram c) minyak johan



Gambar **Error! No text of specified style in document..9** *Staphylococcus aureus* a)tanpa pewarnaan, b)pewarna Gram dan c)minyak biji johan



Gambar **Error! No text of specified style in document..10** *Lactobacillus* sp
a)tanpa pewarnaan, b)pewarna Gram dan c) minyak biji johar

1.5.2 Bakteri Gram Negatif

Hasil pewarnaan pada bakteri Gram positif ditunjukkan pada Gambar 4.9 untuk bakteri *Eschericia coli*, Gambar 4.10 untuk bakteri *Pseudomonas aeruginasa* dan Gambar 4.11 untuk bakteri *Salmonella typhi*. Ketiga Gambar tersebut menunjukkan bahwa morfologi dari ketiga bakteri tersebut tampak dengan pewarnaan Gram dan lebih jelas lagi dengan menggunakan minyak biji johar. Safranin sebagai pewarnaan Gram yang bersifat semipolar dapat dengan mudah melekat pada membran luar bakteri Gram negatif.

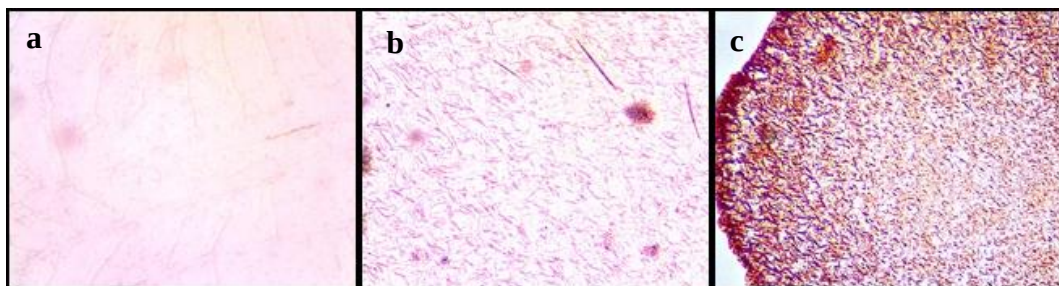
Untuk pewarnaan menggunakan minyak biji johar, visualisasi nampak lebih jelas sebab membran luar dari bakteri Gram negatif yang tersusun dari lipopolisakarida bersifat hidrofobik sehingga minyak dapat dengan mudah terabsorpsi melewati membran luar sehingga mampu memberi warna pada bakteri.



Gambar **Error! No text of specified style in document..11** *Eschericia Coli*
a) tanpa pewarna, b) pewarnaan Gram dan c) minyak biji johar



Gambar **Error! No text of specified style in document..12** *Pseudomonas aeruginosa* a) tanpa pewarnaan, b) pewarnaan Gram dan c) minyak biji johan



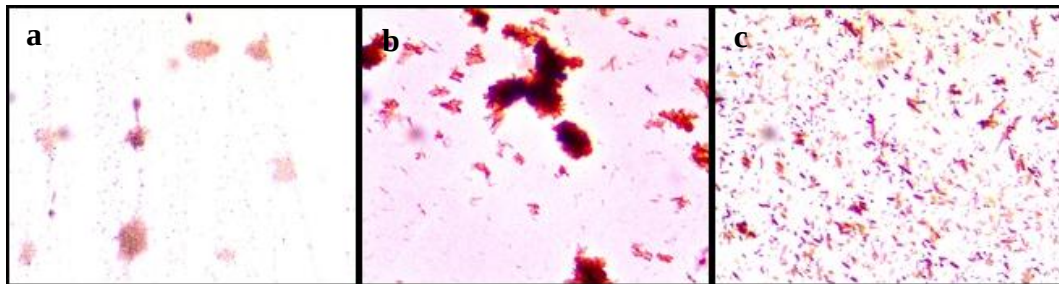
Gambar **Error! No text of specified style in document..13** *Salmonella typhi* a) tanpa pewarnaan, b) pewarnaan Gram dan c) minyak biji johan

1.5.3 Bakteri Tahan Asam

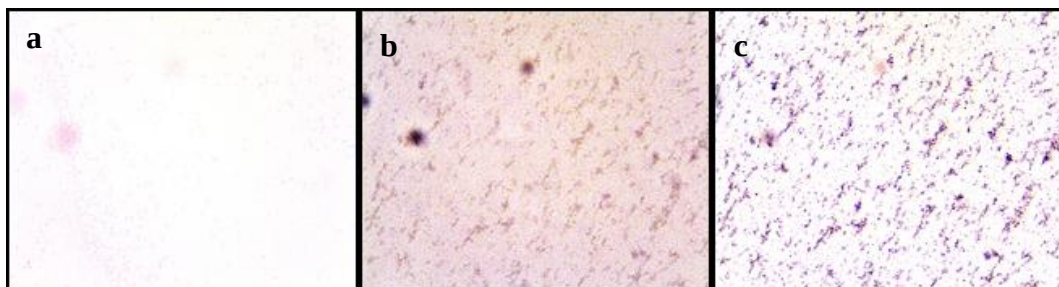
Pada pengamatan bakteri tahan asam, dilakukan fiksasi lebih lama untuk mematikan sel bakteri, sebab bakteri tahan asam bersifat patogen. Setelah difiksasi dan langsung diamati tanpa pewarnaan, maka tampak gelembung-gelembung seperti pada Gambar 4.12 (a), 4.13 (a), dan 4.14 (a). Gelembung-gelembung ini menandakan terdenaturasinya sel bakteri akibat pemanasan (Moyes et al., 2009)

Selanjutnya dilakukan pewarnaan Gram untuk mewarnai ketiga bakteri tahan asam. Pengamatan yang dilakukan dibawah mikroskop menampilkan bakteri bewarna merah muda yang merupakan warna safranin. Hal ini menandakan bahwa bakteri tahan asam juga tergolong bakteri Gram negatif akan tetapi memiliki kandungan lipid yang lebih tinggi. Kandungan lipid yang tinggi dapat menyebabkan kurang kontrasnya pengamatan bakteri terhadap lingkungannya, sebab setelah fiksasi, noda sel bakteri akan melebar dan menyatu sehingga sulit untuk dilakukan pengamatan bakteri seperti pada Gambar 4.12 (b), 4.13(b), dan 4.14(b).

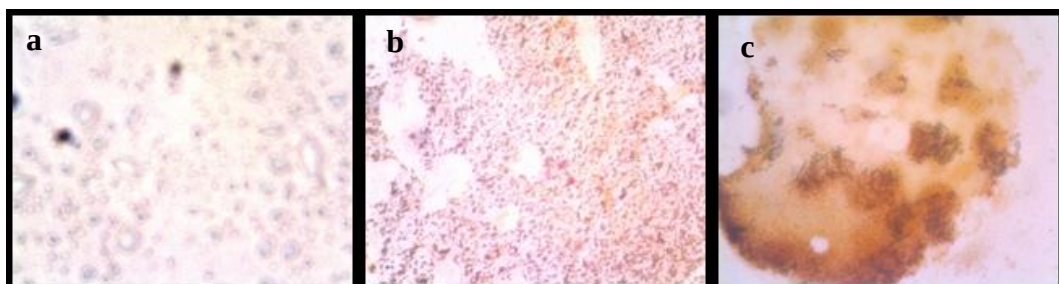
Pada pengamatan bakteri tahan asam menggunakan minyak biji johan, tidak dilakukan fiksasi. Sebab proses pewarnaannya tergolong tipe pewarnaan sederhana, dimana bakteri apusan ditetesi dengan minyak dan langsung diamati dibawah mikroskop. Metode ini berlangsung sangat cepat sehingga cukup aman dilakukan pengamatan sel bakteri hidup.



Gambar **Error! No text of specified style in document..14** *Rickettsia rickettsi* (a) tanpa pewarnaan, (b) pewarnaan Gram dan (c) minyak biji johan



Gambar **Error! No text of specified style in document..15** *Vibrio cholera* (a) tanpa pewarnaan, (b) pewarnaan Gram dan (c) minyak biji johan



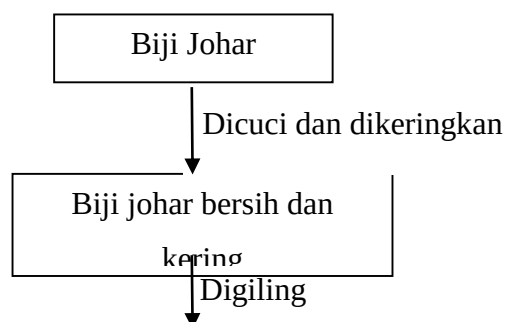
Gambar **Error! No text of specified style in document..16** *Helicobacter Pylori* (a) tanpa pewarnaan, (b) pewarnaan Gram, (c) minyak biji johan

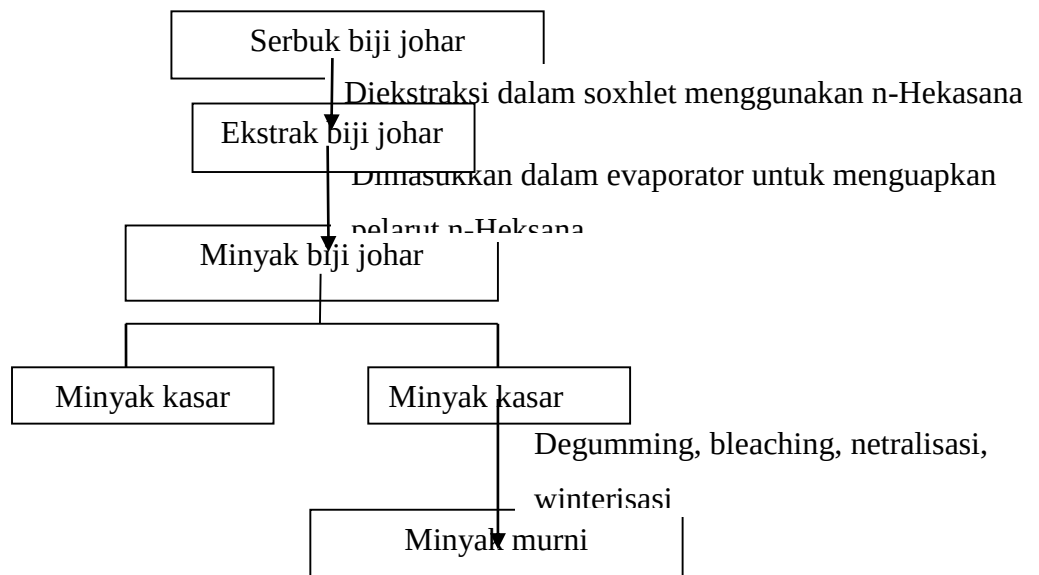
Pewarnaan menggunakan minyak biji johar untuk bakteri tahan asam menghasilkan noda-noda tunggal, tidak menyatu dan tampak kontras seperti pada Gambar 4.12 (c), 4.13(c) dan 4.14(c). Hal ini menandakan bahwa pewarnaan menggunakan minyak biji johar dapat diaplikasikan untuk pengamatan bakteri tahan asam secara *in vivo*.

Perbedaan respon terhadap mekanisme pewarnaan pada bakteri adalah didasarkan pada struktur dan komposisi dinding sel bakteri. Bakteri Gram positif memiliki lapisan peptidoglikan yang tebal namun tidak memiliki membran luar (OM, *outer membrane*) sedangkan bakteri Gram negatif memiliki lipopolisakarida sebagai OM yang menyelubungi lapisan peptidoglikan yang tipis. Bakteri tahan asam memiliki struktur dinding sel yang mirip dengan bakteri Gram negatif namun presentase kandungan lipopolisakaridanya lebih tinggi (Wilhelm dkk, 2015)

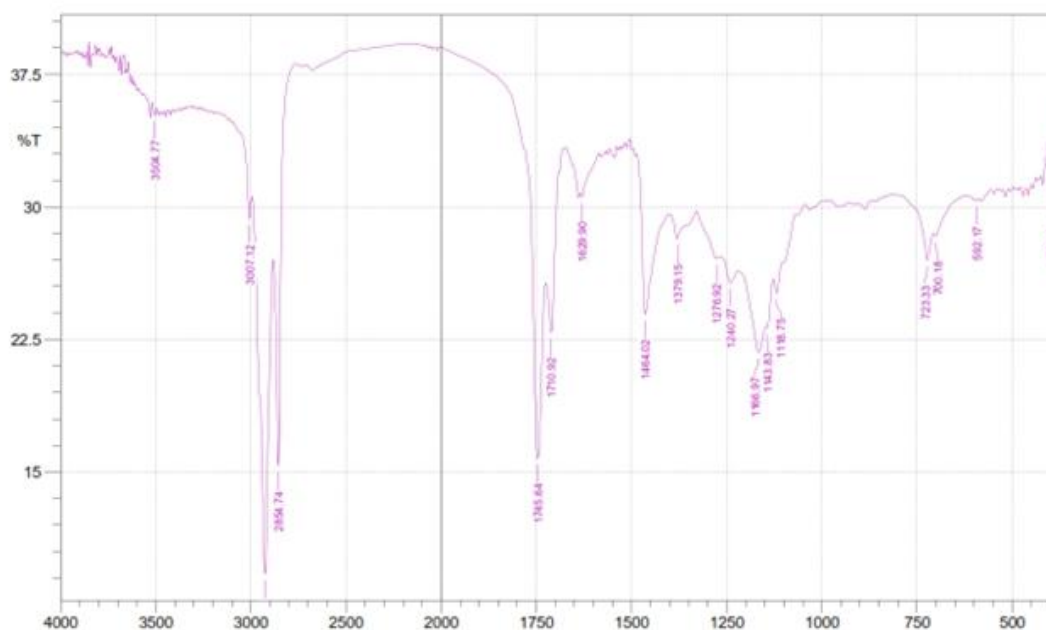
Dibandingkan dengan metode pewarnaan Gram secara sederhana, maka metode pewarnaan minyak biji johar dapat dengan menunjukkan visualisasi yang lebih jelas dengan proses yang lebih cepat dan mudah. Selain itu, metode pewarnaan minyak biji johar juga mampu membedakan jenis bakteri berdasarkan struktur dan komposisi sel bakteri, serta dapat dilakukan untuk sel hidup sehingga layak untuk identifikasi bakteri.

LAMPIRAN



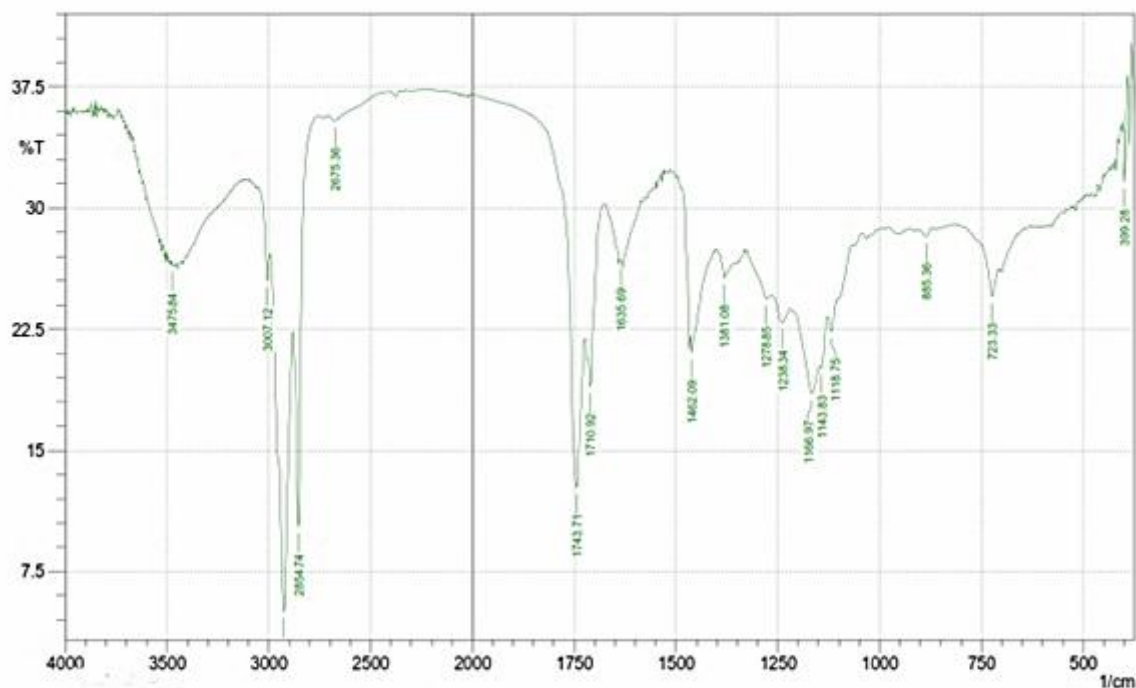


Spektra Hasil Karakterisasi Pheophytin Menggunakan FTIR



Peak	Intensity	Corr. Intensity	Base (H)	Base (L)	Area	Corr. Area
397.35	30.174	4.138	405.06	391.56	6.695	0.411
592.17	30.357	0.098	597.95	586.38	5.984	0.009
700.18	28.342	0.307	705.97	626.89	41.666	-0.207
723.33	27.003	1.932	790.84	705.97	45.339	0.412
1118.75	25.125	1.092	1126.47	1105.25	12.469	0.192
1143.83	23.158	0.591	1147.68	1128.39	11.852	0.132
1166.97	21.773	2.29	1219.05	1147.68	44.343	1.08
1240.27	25.717	1.036	1265.35	1219.05	26.832	0.346
1276.92	27.067	0.596	1329	1265.35	35.042	0.294
1379.15	28.181	1.091	1394.58	1357.93	19.842	0.266
1464.02	23.932	8.131	1485.24	1404.22	45.058	4.053
1629.9	30.565	0.507	1635.69	1585.54	24.938	0.059
1710.92	22.896	5.415	1724.42	1691.63	19.019	1.333
1745.64	15.768	10.814	2002.18	1726.35	128.468	3.876
2854.74	15.323	14.411	2881.75	2771.8	57.501	5.132
2926.11	9.234	19.098	2993.62	2883.68	79.337	19.667
3007.12	29.318	1.982	3063.06	2993.62	34.108	0.089
3504.77	35.181	0.548	3518.28	3497.06	9.557	0.084

Spektra Hasil Karakterisasi Minyak Biji Johar Menggunakan FTIR



Peak	Intensity	Corr. Intensity	Base (H)	Base (L)	Area	Corr. Area
399.28	31.597	4.73	403.14	391.56	5.334	0.308
723.33	24.516	2.102	788.91	709.83	44.882	0.536
885.36	28.228	0.512	904.64	869.92	18.925	0.12
1118.75	22.358	1.465	1126.47	1068.6	34.995	0.61
1143.83	20.094	0.73	1147.68	1128.39	12.913	0.181
1166.97	18.532	2.529	1219.05	1149.61	47.145	1.356
1238.34	22.903	1.177	1263.42	1220.98	26.654	0.455
1278.85	24.392	0.815	1327.07	1265.35	36.562	0.372
1381.08	25.638	1.431	1402.3	1354.07	27.8	0.387
1462.09	21.029	1.242	1464.02	1408.08	34.024	0.253
1635.69	26.695	0.075	1639.55	1633.76	3.315	0.004
1710.92	18.926	2.721	1714.77	1678.13	21.646	0.296
1743.71	12.7	10.954	1855.58	1726.35	72.802	5.084
2675.36	35.386	0.053	2679.21	2544.19	60.025	-0.03
2854.74	10.281	14.956	2879.82	2766.01	66.192	6.692
2926.11	5.031	19.262	2991.69	2881.75	94.248	27.273
3007.12	25.51	2.677	3047.63	2993.62	29.481	0.543
3475.84	26.457	0.166	3479.7	3471.98	4.443	0.008

Perhitungan Penentuan Kadar Minyak

Berat sampel biji johan

Berat ekstrak minyak yang diperoleh

$$\begin{aligned} \text{Kadar minyak (\%)} &= \frac{(\text{berat ekstrak minyak yang diperoleh})}{(\text{berat sampel biji johan})} \times 100\% \\ &= \frac{270,378 \text{ g}}{1988 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 13,601 \% \end{aligned}$$

Perhitungan Bilangan Asam

$$\text{Bilangan asam} = \frac{\text{mL KOH} \times \text{N KOH} \times \text{BM KOH}}{\text{Berat Minyak}}$$

$$\begin{aligned} \text{Bilangan asam} &= \frac{3 \text{ mL KOH} \times 0,01 \text{ N KOH} \times 56,1 \text{ g/mol}}{11 \text{ gram}} \times 100\% \\ &= 16,66\% \end{aligned}$$

Perhitungan Bilangan Peroksida

Bilangan peroksida

$$= \frac{\text{mL natrium tiosulfat} \times \text{N natrium tiosulfat}}{\text{berat minyak}} \times 100\%$$

Bilangan peroksida

$$\begin{aligned} &= \frac{2,77 \text{ mL natrium tiosulfat} \times 0,1 \text{ N natrium tiosulfat}}{5 \text{ gram}} \times 100\% \\ &= 5,54\% \end{aligned}$$

DAFTAR PUSTAKA

- A, E.A., 1957. Method for bleaching vegetable oils. US2795595 A.
- Amils, P.R., 2011. Gram-Positive Bacteria, in: Gargaud, M., Amils, P.R., Quintanilla, J.C., II, H.J. (Jim) C., Irvine, W.M., Pinti, P.D.L., Viso, M. (Eds.), *Encyclopedia of Astrobiology*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 685–685.
- Baron, S. (Ed.), 1996. *Medical Microbiology*, 4th ed. University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston (TX).
- Beveridge, T.J., Davies, J.A., 1983. Cellular responses of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* to the Gram stain. *J. Bacteriol.* 156, 846–858.
- Brooks, G.F., Butel, J.S., Morse, S.A., 2004. *Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology*. Lange Medical Books/McGraw-Hill, Medical Pub. Division.
- Datta, S., Sherman, J.M., Bravard, M.A., Valencia, T., Gilman, R.H., Evans, C.A., 2015. Clinical evaluation of tuberculosis viability microscopy for assessing treatment response. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 60, 1186–1195. doi:10.1093/cid/ciu1153
- Nugraha, Widra D.S., 2012. Asuhan Keperawatan Pada Tn. R dengan Gangguan Sistem Pencernaan TYPHUS. Tugas Akhir UNMUH Surak.
- Dwidjoseputro, D., 2005. *Dasar-dasar mikrobiologi*. UI-PRESS.
- Emerson, D., Agulto, L., Liu, H., Liu, L., 2008. Identifying and Characterizing Bacteria in an Era of Genomics and Proteomics. *BioScience* 58, 925–936. doi:10.1641/B581006
- Faruque, S.M., Nair, G.B., 2008. *Vibrio Cholerae: Genomics and Molecular Biology*. Horizon Scientific Press.
- Foster, T., 1996. *Staphylococcus*, in: Baron, S. (Ed.), *Medical Microbiology*. University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston (TX).
- Ghosh, A., Shrivastav, A., Jose, D.A., Mishra, S.K., Chandrakanth, C.K., Mishra, S., Das, A., 2008. Colorimetric Sensor for Triphosphates and Their Application as a Viable Staining Agent for Prokaryotes and Eukaryotes. *Anal. Chem.* 80, 5312–5319. doi:10.1021/ac8005022
- Indan, E., 2003. *Mikrobiologi dan Parasitologi Untuk Akademi Keperawatan dan Sekolah Tenaga Kesehatan yang Sederajat*. Penerbit Citra Aditya Bakti.
- Ippolito, S.B., Goldberg, B.B., Ünlü, M.S., 2005. Theoretical analysis of numerical aperture increasing lens microscopy. *J. Appl. Phys.* 97, 53105. doi:10.1063/1.1858060

- Korapati, N., 2010. Isolation and Identification of Bacterial Strains and Study of their Resistance to Heavy Metals and Antibiotics. *JMBT* 2, 074–076.
- Kusters, J.G., Vliet, A.H.M. van, Kuipers, E.J., 2006. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 449–490. doi:10.1128/CMR.00054-05
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Stahl, D., Clark, D.P., 2010. *Brock Biology of Microorganisms*, 13 edition. ed. Pearson, San Francisco.
- Montet, D., Ray, R.C., 2011. *Aquaculture Microbiology and Biotechnology*, Volume Two. CRC Press.
- Moyes, R.B., Reynolds, J., Breakwell, D.P., 2009. Differential staining of bacteria: gram stain. *Curr. Protoc. Microbiol.* Appendix 3C. doi:10.1002/9780471729259.mca03cs15
- OM Agbogidi, CO Egbuchua, 2010. Heavy metal concentrations of soil contaminated with spent engine oil in Asaba, Delta State. *Acta Agron. Niger.* 10, 65–69.
- Panizzi, P., Nahrendorf, M., Figueiredo, J.-L., Panizzi, J., Marinelli, B., Iwamoto, Y., Keliher, E., Maddur, A.A., 2011. In vivo detection of *Staphylococcus aureus* endocarditis by targeting pathogen-specific prothrombin activation. *Nat. Med.* 17, 1142–1146. doi:10.1038/nm.2423
- Parker, F., 2012. *Applications of Infrared Spectroscopy in Biochemistry, Biology, and Medicine*. Springer Science & Business Media.
- Ring, J., Hoerr, V., Tuscherr, L., Kuhlmann, M.T., Löffler, B., Faber, C., 2014. MRI Visualization of *Staphylococcus aureus* -Induced Infective Endocarditis in Mice. *PLOS ONE* 9, e107179. doi:10.1371/journal.pone.0107179
- Silhavy, T.J., Kahne, D., Walker, S., 2010. *The Bacterial Cell Envelope*. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2. doi:10.1101/cshperspect.a000414
- Sutheimer, S., Caster, J.M., Smith, S.H., 2015. Green Soap: An Extraction and Saponification of Avocado Oil. *J. Chem. Educ.* 92, 1763–1765. doi:10.1021/acs.jchemed.5b00188
- Wilhelm, M.J., Sheffield, J.B., Sharifian Gh., M., Wu, Y., Spahr, C., Gonella, G., Xu, B., Dai, H.-L., 2015. Gram's Stain Does Not Cross the Bacterial Cytoplasmic Membrane. *ACS Chem. Biol.* 10, 1711–1717. doi:10.1021/acschembio.5b00042

BIOGRAFI PENULIS



Penulis yang mempunyai nama lengkap **Andi Nina Asriana** ini dilahirkan di Ujungpadang, Sulawesi Selatan pada tanggal 15 Nopember 1985. Penulis merupakan anak keempat dari enam bersaudara dari pasangan Bapak Andi Alimuddin Hamzah, SE dan Ibu Dra. Andi Rahmawaty Ramli. Pendidikan pertama penulis dimulai dari Taman Kanak-Kanak di TK Aisyah, Makassar tahun 1991 dan dilanjutkan dengan pendidikan dasar di SDN Batua I di Makassar tahun 1992. Pada tahun 1998, penulis menempuh pendidikan menengah pertama di SMPN 8 Makassar, kemudian pendidikan menengah atas di SMAN 5 Makassar di tahun 2004.

Penulis diterima di Universitas Negeri Makassar (UNM) Jurusan Kimia Fakultas MIPA melalui jalur SPMB dan terdaftar dengan NRP. 041314032. Penulis mengambil bidang minat Kimia Analitik dibawah bimbingan ibu Zulfikar, Ph.D dan Jusniar, S.Pd., M.Pd., dengan skripsi yang berjudul “Total Nitrogen dan Total Fosfor Pada Drainase Perkotaan Makassar” (2008-2010). Penulis melanjutkan pendidikannya di Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS) pada Program Pascasarjana Jurusan Kimia, FMIPA-ITS dengan beasiswa dari DIKTI melalui Program Pra S2-S2 Saintek dan terdaftar dengan NRP 1414201007. Penulis mengambil bidang minat Kimia Analitik dibawah bimbingan Dr. rer. nat. Fredy Kurniawan, M.Si. Penulis dapat dihubungi melalui ninahimura@gmail.com.