

**UJI AKTIVITAS ANTIMIKROBA BUAH PATIKALA
(*Etilingera elatior* (Jack) R.M Smith) DAN PROFIL
SENYAWA DENGAN METODE KLT BIOAUTOGRAFI**

**ANTIMICROBIAL ACTIVITY TEST OF PATIKALA
FRUIT (*Etilingera elatior* (Jack) R.M Smith) AND ITS
COMPOUND PROFILE WITH TLC BIOAUTOGRAPHY
METHOD**

**DHEANAWATI PUTRI
N111 14 013**



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2021**

**UJI AKTIVITAS ANTIMIKROBA BUAH PATIKALA (*Etlingera elatior*
(Jack) R.M Smith) DAN PROFIL SENYAWA DENGAN METODE KLT
BIOAUTOGRAFI**

**ANTIMICROBIAL ACTIVITY TEST OF PATIKALA FRUIT (*Etlingera*
elatior (Jack) R.M Smith) AND ITS COMPOUND PROFILE WITH TLC
BIOAUTOGRAPHY METHOD**

SKRIPSI

Untuk melengkapi tugas-tugas dan memenuhi
syarat-syarat untuk mencapai gelar sarjana

**DHEANAWATI PUTRI
N111 14 013**

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2021**

UJI AKTIVITAS ANTIMIKROBA BUAH PATIKALA (*Etilingera elatior*
(Jack) R.M Smith) DAN PROFIL SENYAWA DENGAN METODE KLT
BIOAUTOGRAFI

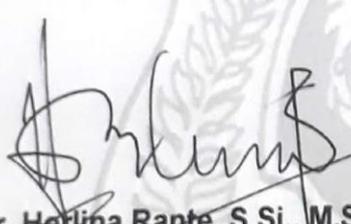
DHEANAWATI PUTRI
N111 14 013

UNIVERSITAS HASANUDDIN

Disetujui oleh:

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping,


Dr. Herlina Rante, S.Si., M.Si., Apt
NIP. 19771125 200212 2 003


M. Raihan, S.Si., M.Sc.Stud., Apt
NIP. 19900528 201504 1 001

Pada tanggal: 28 - 09 - 2021

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

UJI AKTIVITAS ANTIMIKROBA BUAH PATIKALA (*Etilingera elatior*
(Jack) R.M Smith) DAN PROFIL SENYAWA DENGAN METODE KLT
BIOAUTOGRAFI

ANTIMICROBIAL ACTIVITY TEST OF PATIKALA FRUIT (*Etilingera*
elatior (Jack) R.M Smith) AND ITS COMPOUND PROFILE WITH TLC
BIOAUTOGRAPHY METHOD

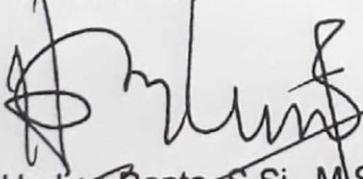
Disusun dan diajukan oleh:

DHEANAWATI PUTRI
N111 14 013

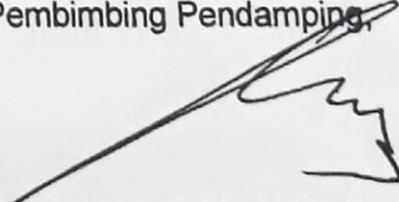
Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam
rangka Penyelesaian Studi Program Sarjana Program Studi Farmasi
Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin
pada tanggal, 2021
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui,

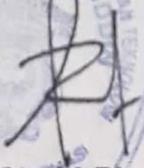
Pembimbing Utama,


Dr. Herlina Rante, S.Si., M.Si., Apt
NIP. 19771125 200212 2 003

Pembimbing Pendamping,


M. Raihan, S.Si., M.Sc.Stud., Apt
NIP. 19900528 201504 1 001

Ketua Program Studi S1 Farmasi
Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin


Firzan Nainu, S.Si., M.Biomed., Ph.D., Apt
NIP. 19820610 200801 1 012

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Dheanawati Putri

NIM : N111 14 013

Program Studi : Farmasi

Jenjang : S1

Dengan ini saya menyatakan bahwa tulisan saya yang berjudul Uji Aktivitas Antimikroba Tanaman Patikala (*Etilingera elatior* (Jack) R. M. Smith) dan Profil Senyawa dengan Metode KLT Bioautografi merupakan karya saya sendiri dan bukan merupakan pengambil alihan tulisan orang lain.

Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa pernyataan saya ini tidak benar, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 21 September 2021

: menyatakan



Dheanawati Putri
N111 14 013

UCAPAN TERIMAKASIH

Dengan menyebut nama Allah SWT yang Maha Pengasih lagi Maha Panyayang, penulis panjatkan puja dan puji syukur atas kehadiran-Nya, yang telah melimpahkan rahmat, hidayah, dan inayah-Nya kepada penulis, sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.

Banyak kendala yang dihadapi penulis dalam menyelesaikan rangkaian skripsi ini, namun karena banyak bantuan dan dukungan yang penulis terima dari banyak pihak sehingga penulis dapat melalui kendala tersebut. Oleh karena itu, penulis menghaturkan banyak terima kasih dan penghargaan setinggi-tingginya kepada

1. Ibu Dr. Herlina Rante, S.Si., M.Si., Apt. selaku pembimbing utama dan Bapak M. Raihan, S.Si., M.Sc.Stud., Apt. selaku pembimbing pertama skripsi yang telah meluangkan waktu, tenaga, dan ilmunya dalam memberikan pengarahan kepada penulis mulai dari awal rencana penulisan skripsi hingga selesai.
2. Bapak Prof. Dr. H. M. Natsir Djide, MS. Apt. selaku pembimbing akademik yang telah meluangkan waktu, tenaga dan ilmunya untuk memberikan masukan dari semester awal hingga akhir.
3. Kepada Bapak Dekan, Wakil Dekan dan Bapak/Ibu dosen Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin, terima kasih atas ilmu, tenaga, dan setiap nasehat serta pengalaman yang telah diberikan selama penulis menjalani perkuliahan serta seluruh staf Fakultas Farmasi yang telah membantu penulis.

4. Seluruh laboran Fakultas Farmasi UNHAS terkhusus untuk kak Lia yang sangat membantu atas segala kebutuhan penulis pada saat penelitian hingga selesai.
5. Teman-teman dekat penulis selama berkuliah di Farmasi, khususnya teman-teman Chaerunnisa Indra, Nahdiah Widyakusumastuti, Gretya Mayelan P, Dia Ananda Triana, Nurfatmasari, Khusnul Pratiwi Hadi yang telah memberikan semangat, dukungan, doa, moril dan dorongan kepada penulis selama kuliah di Farmasi dan dalam penyusunan skripsi.
6. Kepada Asriyani Suaib yang selalu memberikan bantuan dan hiburan kepada penulis selama proses penelitian dan pengerjaan skripsi.
7. Kepada Winda Dewi Mulia Setiawaty, Sakinatul Khaer, Chita Vionanda, Zul Maghfirah, dan Putry Charunia yang memberikan bantuan, semangat, dan hiburan kepada penulis selama proses penyelesaian skripsi.
8. Kepada teman-teman Hios14min (Farmasi Unhas angkatan 14) yang telah memberikan semangat, dukungan, doa, moril, dan dorongan kepada penulis selama ini.
9. Serta berbagai pihak yang telah banyak membantu penulis dan tidak sempat disebutkan namanya satu per satu.

Orang tua yang tercinta terkhusus untuk Ibu Endahwati dan Bapak Muhammad Idam tercinta yang selama ini telah membantu penulis dalam bentuk perhatian, dukungan materil dan senantiasa mendengar semua

keluh kesah yang penulis alami, semangat serta doa yang setiap saat dipanjatkan demi kelancaran dan kesuksesan penulis selama menjalankan kuliah dan menyelesaikan tugas akhir.

Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan sehingga skripsi ini jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu, penulis mengharapkan kritik dan saran agar dapat menghasilkan karya yang lebih baik lagi. Semoga karya ini dapat bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan.

Makassar, Desember 2020

Dheanawati Putri

ABSTRAK

DHEANAWATI PUTRI. Uji Aktivitas Antimikroba Buah Patikala (*Etilingera elatior* (Jack) R.M Smith) dan Profil Senyawa dengan Metode KLT Bioautografi (dibimbing oleh Herlina Rante dan Muhammad Raihan).

Tanaman patikala memiliki senyawa metabolit sekunder seperti, fenol, flavanoid, glikosida, tanin, saponin, terpenoid, yang telah diketahui sebagai senyawa bioaktif. Ekstrak daun, rimpang dan perbungaan ditemukan memiliki aktivitas antibakteri dan antijamur terhadap berbagai mikroba. Tujuan penelitian ini yaitu untuk menentukan profil senyawa aktif dan menentukan aktivitas antimikroba Patikala (*Etilingera elatior* (Jack) R.M Smith) dengan metode KLT Bioautografi. Uji aktivitas antimikroba Ekstrak biji dan kulit buah Patikala dilakukan dengan metode difusi dengan menguji konsentrasi 10%, 5%, 2,5%, dan 1,25% pada masing-masing ekstrak serta menggunakan 3 mikroba uji yaitu *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan *Candida albicans*. Untuk penentuan profil senyawa digunakan metode KLT bioautografi dengan perbandingan fase gerak kloroform : metanol (2:1). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa konsentrasi 10% pada ekstrak biji patikala memiliki zona hambat terbesar dengan diameter rata-rata 12,72 mm pada *Staphylococcus aureus*, 12,00 mm pada *Escherichia coli*, dan 30,63 mm pada *Candida albicans*. Hasil pengujian KLT pada ekstrak biji patikala diperoleh 3 noda dengan nilai Rf 0,54; 0,63; 0,72. Untuk hasil pengujian dengan metode KLT bioautografi noda dengan nilai Rf 0,63 yang berhasil menghambat mikroba uji.

Kata Kunci : Antimikroba, KLT Bioautografi, Patikala (*Etilingera elatior* (Jack) R.M Smith).

ABSTRACT

DHEANAWATI PUTRI. Antimicrobial Activity Test Of Patikala Fruit (*Etilingera elatior* (Jack) R.M Smith) And Its Compound Profiles With TLC Bioautography Method (supervised by Herlina Rante and Muhammad Raihan).

Patikala contains secondary metabolites like phenol, flavonoids, glycosides, tannins, saponins, and terpenoids that have been reported for its bioactivities. Leaves, rhizomes, and flowers were reported to have antibacterial and antifungal activity against various microbes. The purpose of this research is to obtain the profile of the active compound and determine antimicrobial activity from Patikala fruit (*Etilingera elatior* (Jack) R.M Smith) with TLC bioautography method. The antimicrobial activity test of the seed extract and skin extract of Patikala fruit was carried out by diffusion method by testing the concentration of 10%, 5%, 2,5%, and 1,25% on each extract and also using 3 test microbes namely *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. Profile determination of compounds used TLC bioautography method with mobile phase comparison chloroform : methanol (2:1). The result of the research shown that 10% concentration on seed extract patikala has the largest zone of inhibition with average diameter 12,72 mm on *Staphylococcus aureus*, 12,00 mm on *Escherichia coli*, and 30,63 mm on *Candida albicans*. The test result of TLC on patikala seed extract obtained 3 stains with Rf value 0,54; 0,63; 0,72. For the test result with TLC bioautography method, the stain with Rf value of 0,63 successfully inhibited the microbial growth.

Keywords : Antimicrobial, TLC Bioautography, Patikala (*Etilingera elatior* (Jack) R.M Smith).

DAFTAR ISI

	halaman
UCAPAN TERIMA KASIH	vi
ABSTRAK	ix
ABSTRACT	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB I PENDAHULUAN	1
I.1 Latar Belakang	1
I.2 Rumusan Masalah	3
I.3 Tujuan Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
II.1 Deskripsi Tanaman Patikala (<i>Etilingera elatior</i> (Jack) R.M. Smith)	4
II.1.1 Klasifikasi Tanaman Patikala (<i>Etilingera elatior</i>)	4
II.1.2 Morfologi Patikala	5
II.1.3 Kandungan Senyawa Patikala	6
II.2 Ekstraksi	6
II.2.1 Cara Dingin	7
II.2.2 Cara Panas	8
II.3 Deskripsi Mikroorganismenya	9
II.3.1 Fungi <i>Candida albican</i>	10
II.3.2 Bakteri <i>Escherichia coli</i>	11

II.3.3 Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	13
II.4 Antimikroba	15
II.4.1 Mekanisme Kerja Antimikroba	15
II.4.2 Efektivitas Antimikroba	18
II.5 Uji Aktivitas Antimikroba	18
II.5.1 Metode Difusi	18
II.5.2 Metode Dilusi	21
II.5.3 Metode Bioautografi	23
II.6 Kromatografi Lapis Tipis	25
BAB III METODE KERJA	27
III.1 Alat dan Bahan	27
III.2 Metode Penelitian	27
III.2.1 Pengambilan dan Pengolahan Sampel	27
III.2.2 Ekstraksi Sampel	28
III.2.3 Pembuatan Suspensi Ekstrak	28
III.2.4 Sterilisasi alat	28
III.2.5 Pembuatan Media Biakan	29
III.2.6 Penyiapan Bakteri Uji	30
III.2.7 Pengujian Ekstrak	31
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	33
IV.1 Ekstrak Buah Patikala (<i>Etilingera elatior</i> Jack R.M Smith)	33
IV.2 Hasil Penentuan Daya Hambat	33
IV.3 KLT Bioautografi dan Profil Senyawa KLT	35

BAB V PENUTUP	37
V.I Kesimpulan	37
V.II Saran	37
Daftar Pustaka	38
Lampiran	41

DAFTAR TABEL

Tabel	halaman
1. Hasil Uji Daya Hambat	34

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Buah Patikala	5
2. Fungi <i>Candida albican</i>	11
3. Bakteri <i>Eschericia coli</i>	12
4. Bakteri <i>Staphyloccocus aureus</i>	14
5. Hasil Penampakan Noda	35
6. Hasil Semprot Pereaksi	36

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Skema Kerja	41
2. Komposisi Bahan	42
3. Dokumentasi Penelitian	43

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara yang kaya akan biodiversitas baik berupa tanaman, hewan dan sumber daya. Salah satu tanaman asli Indonesia yang terkenal yaitu Patikala (*Etilingera elatior* (Jack) R.M Smith). Di Indoneisa, tunas perbungaan seperti Patikala atau yang lebih dikenal sebagai kecombrang dibudidayakan terutama untuk tujuan kuliner sebagai penambah rasa dalam hidangan tradisional dan sebagai sumber nutrisi. Selain berfungsi pada kuliner, patikala juga dapat digunakan sebagai alternatif pengobatan karena kandungan senyawanya sebagai tanaman obat (Juwita *et al.* 2018).

Tanaman patikala memiliki senyawa metabolit sekunder seperti, fenol, flavonoid, glikosida, tanin, saponin, terpenoid, yang telah diketahui sebagai senyawa bioaktif. Ekstrak daun, rimpang dan perbungaan ditemukan memiliki aktivitas antibakteri dan antijamur terhadap berbagai mikroba. Bioaktif utama ini memiliki berbagai efek menguntungkan pada kesehatan manusia termasuk pencegahan stres oksidatif dengan menghilangkan radikal bebas dan memiliki efek antimikroba (Juwita *et al.*, 2018).

Efek antimikroba pada kandungan senyawa Patikala dapat menghambat bakteri gram positif dan bakteri gram negatif (Aziman *et al.*, 2014). Sekitar 52% dari ekstrak Patikala menghambat bakteri *Staphylococcus aureus* dan daun Patikala menunjukkan aktivitas

antimikroba tertinggi (Chan *et al.*, 2006). Menurut (Ghasemzadeh *et al.*, 2015) ekstrak bunga patikala menunjukkan aktivitas antibakteri yang menghambat *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, dan *Pseudomonas aeruginosa*. Minyak atsiri berupa eugenol dan decanol yang terkandung dalam ekstrak bunga Patikala memiliki aktivitas dalam menghambat *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Candida albicans*, dan *Cryptococcus neoformans* (Susanti *et al.*, 2013).

Beberapa mikroorganisme yang dapat dihambat oleh senyawa Patikala merupakan mikroorganisme yang sering menyebabkan infeksi. Infeksi merupakan masalah kesehatan yang paling serius di dunia hingga awal abad ke-20 ketika penyakit degeneratif kronis mulai mendominasi negara berkembang. Infeksi adalah istilah yang mendefinisikan masuk dan berkembangnya agen penginfeksi pada manusia atau binatang dan berkembang menjadi sebuah penyakit (Barreto, 2006). Antimikroba memiliki peranan penting dalam mengatasi masalah infeksi sehingga dapat meningkatkan kesehatan dan kualitas hidup masyarakat (Buchy, 2019).

Antimikroba merupakan bahan-bahan atau obat-obat yang bertindak untuk melawan semua jenis tipe mikroorganisme seperti antibiotik, antiviral, antifungal, dan antiparasitik (Nathwani *et al.*, 2018). Antibiotik telah merevolusi praktik pengobatan dengan memungkinkan terobosan di seluruh spektrum klinis obat-obatan, termasuk persalinan

yang lebih aman, prosedur bedah, transplantasi organ, dan rejimen kemoterapi myeloablative. Namun, resistensi antimikroba (AMR) mengancam dapat menghambat dan bahkan membalikkan sebagian dari kemajuan ini (Marston *et al.*, 2016).

Oleh karena itu, perlu dilakukan uji aktivitas antimikroba senyawa metabolit sekunder pada tanaman Patikala dan profil senyawa aktif dengan KLT-Bioautografi sebagai solusi untuk mengatasi masalah resistensi antimikroba.

I.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian tersebut maka muncul permasalahan apakah senyawa antimikroba terdapat pada buah Patikala (*E. elatior* (Jack) R.M Smith) dan bagaimana profil senyawa aktif berdasarkan KLT-Bioautografi?

I.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk menentukan profil KLT senyawa aktif dan menentukan aktivitas antimikroba dari buah Patikala (*E. elatior* (Jack) R.M Smith).

BAB II

TINJUAN PUSTAKA

II.1 Deskripsi Tanaman Patikala (*Etilingera elatior* (Jack) R.M. Smith)

II.1.1 Klasifikasi Patikala (*Etilingera elatior*)

Tanaman patikala diklasifikasikan sebagai berikut (Hidayat SS dan Hutapea, 1991):

Kingdom : Plantae

Divisi : Spermathophyta

Kelas : Monocotyledonae

Ordo : Zingiberales

Famili : Zingiberaceae

Genus : *Etilingera*

Spesies : *Etilingera elatior*

Etilingera elatior (Jack) R.M. Smith pertama kali diperkenalkan oleh Rosemary Margareth Smith dari *The Royal Gardens Edinburgh* pada tahun 1980. Poulsen (2003) menemukan sekitar 70 spesies tanaman honje atau kecombrang atau patikala dari keluarga Zingiberaceae yang tersebar dari India sampai kepulauan Pasifik dan sebagian besar belum teridentifikasi.

Sinonim dari *Etilingera elatior* (Jack) R.M Smith diantaranya *Nicolaia elatior* (Jack) Horan, *Phaeomeria magnifika* (Roscoe) K. Schum, *Elettaria speciosa* Blume, *Alpinia magnifika* Roscoe, atau *Alpinia elatior* Jack. Patikala merupakan tanaman hias tropik yang dikenal dengan nama lain

Torch ginger (Inggris), Kecombrang (Indonesia), Daalaa (Thailand), dan Kantan (Malaysia) (Hidayat SS, 1991).

Nama daerah *Etilingera elatior* untuk wilayah Indonesia diantaranya Kincung (Medan), Bungong Kala (Aceh), Bunga Rias (Tapanuli), Asam Cekala (Karo), Kumbang Sekala (Lampung), Sambuang (Minangkabau), Patikala (Palopo), dan Lucu (Banyuwangi) (Hidayat SS, 1991).



Gambar 1. Buah Patikala

II.1.2 Morfologi Patikala (*Etilingera elatior*)

Patikala atau asam patikala merupakan tanaman perbungaan yang banyak dibudidayakan di Indonesia khusus untuk tujuan kuliner sebagai penambah rasa pada hidangan tradisional dan sebagai sumber nutrisi. Tanaman patikala dapat tumbuh dengan tinggi hingga 3-6 meter. Patikala memiliki batang berjenis *pseudostem* atau batang semu yang terbentuk karena adanya selebung daun yang tumpang tindih dan padat. Daunnya banyak dan berwarna hijau tua dengan panjang daun 38–85 cm dan lebar daun 8–18 cm. Helai daun berbentuk lanset dan tidak berambut.

Sepanjang 1,5 cm terdapat *ligule* atau tonjolan tipis yang terdapat pada persimpangan daun dan batang (Juwita *et al.*, 2018).

Bunga patikala termasuk dalam bunga majemuk terbatas yang mekar pada ujung tangkai. Bentuk bunganya bulat oval seperti telur yang terdiri dari bunga yang saling tumpang tindih secara *spiral*. Pada persimpangan bunga tumbuh daun pelindung berwarna merah muda mencolok. Ukuran bunga patikala dengan panjang 60–150 cm dan lebar 0,8–1,5 cm. *Labellum* pada patikala memiliki pinggiran berwarna kuning atau putih. Buah patikala berwarna hijau atau merah dengan banyak biji berwarna hitam. Ukuran buah patikala dengan diameter 2–2,5 cm dan berbentuk bulat (Juwita *et al.*, 2018).

II.1.2 Kandungan Senyawa Patikala (*Etilingera elatior*)

Patikala banyak digunakan secara empiris sebagai obat tradisional karena tingkat kandungan metabolit sekunder yang tinggi seperti fenol, flavonoid, glikosida, saponin, tanin, steroid, dan terpenoid. Selain itu, minyak atsiri juga banyak ditemukan pada patikala. Minyak atsiri didominasi oleh monoterpen hidrokarbon, derivat monoterpen teroksigenasi, derivat sesquiterpen teroksigenasi, dan sesquiterpen hidrokarbon (Juwita *et al.*, 2018).

II.2 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses penarikan kandungan senyawa kimia pada tanaman yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak larut dengan pelarut cair. Senyawa aktif yang dapat larut digolongkan

menjadi minyak atsiri, alkaloid, flavonoid, dan lain-lain. Sedangkan, senyawa yang tidak larut pada pelarut cair berupa karbohidrat, protein, dan lain-lain. Struktur kimia yang berbeda-beda mempengaruhi stabilitas serta kelarutan senyawa terhadap pemanasan, udara, cahaya, logam berat, dan derajat keasaman (Ditjen POM, 2000).

Hasil dari proses ekstraksi disebut sebagai ekstrak yang merupakan sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia dengan menggunakan pelarut yang sesuai dan kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan (Ditjen POM, 2000).

Dengan menggunakan metode ekstraksi dapat dikelompokkan menjadi dua, yaitu dengan cara dingin dan cara panas.

II.2.1 Cara Dingin

Menurut Ditjen POM 2000, metode ekstraksi dengan cara dingin dapat dibagi menjadi:

II.2.1.1 Maserasi

Maserasi merupakan proses pengekstraksian simplisia dengan pelarut yang sesuai dengan beberapa kali pengadukan atau pengocokan pada suhu kamar. Secara teknis prinsip maserasi merupakan ekstraksi yang berdasarkan pada pencapaian keseimbangan konsentrasi antara di luar sel dan di dalam sel. Terdapat beberapa istilah dalam metode maserasi seperti maserasi kinetik dan remaserasi. Maserasi kinetik merupakan proses maserasi yang dilakukan dengan cara pengadukan secara terus menerus. Sedangkan remaserasi merupakan proses

maserasi yang melakukan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan pengulangan penyaringan maserat pertama dan seterusnya.

II.2.1.2 Perkolasi

Perkolasi merupakan proses ekstraksi dengan menggunakan pelarut yang selalu baru hingga menghasilkan perkolat yang sempurna (*exhaustive extraction*) yang pada umumnya dilakukan pada suhu ruang. Metode ini terdiri dari tahapan pengembangan bahan pada tahap maserasi antara tahap perkolasi yang sebenarnya (penetasan/penampungan ekstrak) secara terus-menerus hingga diperoleh ekstrak/perkolat yang jumlahnya 1–5 kali bahan. Pada ekstraksi ini dibutuhkan pelarut yang lebih banyak.

II.2.2 Cara Panas

Menurut Ditjen POM 2000, metode ekstraksi dengan cara panas dapat dibagi menjadi:

II.2.2.1 Refluks

Refluks merupakan proses ekstraksi yang menggunakan suhu titik didih pada pelarut dengan waktu tertentu dan jumlah pelarut yang relatif konstan dengan adanya kondensasi. Refluks umumnya dilakukan proses pengulangan pada residu pertama 3-5 kali pengulangan sehingga dapat termasuk proses ekstraksi yang sempurna.

II.2.2.2 Soxhletasi

Soxhletasi merupakan proses ekstraksi menggunakan pelarut yang selalu baru dan pada umumnya dilakukan menggunakan alat khusus

sehingga terjadi ekstraksi secara kontinu dengan jumlah pelarut yang relatif konstan dengan adanya kondensasi.

II.2.2.3 Digesti

Digesti merupakan proses maserasi kinetik yaitu dengan pengadukan kontinu yang dilakukan pada suhu yang lebih tinggi dibandingkan dengan suhu ruang. Pada umumnya dilakukan pada suhu 40⁰–50⁰C.

II.2.2.4 Infus

Infus merupakan proses ekstraksi menggunakan pelarut air pada penangas air dengan suhu 90⁰C selama waktu 15 menit (Farmakope Indonesia, 1995). Hasil yang diperoleh dari proses infus menghasilkan ekstrak yang tidak stabil dan mudah tercemari oleh mikroorganisme sehingga ekstrak tidak boleh disampai lebih dari 24 jam. Selain itu, proses infus dilakukan untuk mengekstrak zat aktif yang larut pada pelarut air.

II.2.2.5 Dekok

Dekok merupakan infus dengan waktu yang lebih lama sekitar > 30 menit dan suhu sampai titik didih air.

II.3 Deskripsi Mikroorganisme

Mikroorganisme merupakan makhluk hidup yang memiliki ukuran kecil yang tidak bisa diamati tanpa menggunakan bantuan mikroskop. Mikroorganisme dapat digolongkan menjadi mikroorganisme yang terdiri

atas hanya satu sel (uniseluler) dan mikroorganisme yang terdiri atas banyak sel (multiseluler) (Djide dan Sartini, 2013).

II.3.1 Fungi *Candida albican*

Candida berasal dari bahasa Latin *candidus* yang berarti putih bersinar yang berhubungan dengan ragi lembut yang bersinar. *Albican* berasal dari bahasa Latin *albico* yang berarti menjadi putih (Hameed, 2018).

II.3.1.1 Klasifikasi Fungi *Candida albican*

Candida albican memiliki klasifikasi sebagai berikut (Hameed, 2018):

Kingdom : Fungi

Divisi : Ascomycota

Kelas : Ascomycetes

Ordo : Saccharomycetales

Famili : Saccharomyceteceae

Genus : *Candida*

Spesies : *Candida albican*

II.3.1.2 Morfologi Fungi *Candida albican*

Candida albican merupakan mikroorganisme oportunistik bersifat patogen yang banyak ditemukan di lingkungan, terutama pada tanaman berbunga, air dan debu. Selain itu, *Candida albican* merupakan flora normal pada kulit, oral, gastrointestinal, vagina, dan saluran kemih (Hammed, 2018). *Candida albican* memiliki morfologi seperti jamur, berdinding lunak, menampilkan globular berbentuk oval, Gram-positif,

memiliki diameter 5 μm . Reproduksi *Candida albicans* secara aseksual oleh tunas dan relatif lebih besar dari bakteri (Hameed, 2018).



Gambar 2. Gambar *Candida albicans* (Dadar et al, 2018)

Candida albicans dapat memfermentasi glukosa dan gula lainnya untuk pembuatan etanol yang lebih berkarakteristik. *Candida albicans* merupakan jamur dimorfik yang memiliki kemampuan untuk mengkonfigurasi dua bentuk (Hameed, 2018).

II.3.2 Bakteri *Escherichia coli*

Escherichia coli merupakan bakteri gram negatif yang pertama kali ditemukan pada tahun 1885 oleh ilmuwan Jerman bernama *Theodor Escherich* yang mengisolasi bakteri tersebut dari feses bayi (Blount, 2015).

II.3.2.1 Klasifikasi Bakteri *Escherichia coli*

Escherichia coli dapat diklasifikasikan sebagai berikut (Krieg, et al, 1984):

Kingdom : Protozoa

Divisi : Bacteria

Kelas : Schizomycetes

Ordo : Eubacteriales

Famili : Enterobacteriaceae

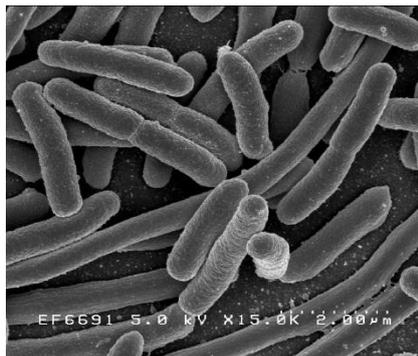
Genus : Escherichia

Spesies : *Escherichia coli*

II.3.2.2 Morfologi Bakteri *Escherichia coli*

Escherichia coli merupakan bakteri Gram-negatif yang berbentuk batang dan termasuk bakteri anaerob fakultatif yang ditandai dengan kemampuan dalam memfermentasi glukosa dan gula lainnya menjadi bentuk lain dalam kondisi anaerob serta tidak menghasilkan enzim oksidase. Sel-sel *Escherichia coli* berukuran panjang 2–6 mm dan lebar 1,1–1,5 mm dan terdiri dari batang lurus tunggal (Desmarchelier, 2016).

Escherichia coli memiliki embelan yang disebut flagela dan digunakan sebagai pergerakan bakteri. Selain itu juga, terdapat struktur yang lebih kecil, memiliki komposisi dari protein yang disebut fimbria yang berperan dalam perlekatan pada permukaan termasuk sel lain atau sel inang.



Gambar 3. Gambar *Escherichia coli* (Desmarchelier, 2016)

Escherichia coli merupakan bakteri patogen yang menyebabkan diare pada manusia yang dikelompokkan berdasarkan sifat virulensi dan manifestasi kliniknya (Desmarchelier, 2016).

Escherichia coli dapat tumbuh dengan cepat dalam kondisi pertumbuhan optimal yaitu dengan cara bereplikasi setara dengan waktu 20 menit. *Escherichia coli* biasa digunakan sebagai bakteri indikator tinja (FIB) untuk menilai kualitas air, kelangsungan hidup, dan pertumbuhan *Escherichia coli* di lingkungan (Jang, 2017).

II.3.3 Bakteri *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus berasal dari bahasa Yunani *staphyle* yang berarti kelompok buah anggur dan *coccus* yang berarti bulat, *aureus* berasal dari kata aurum yang berarti emas (Gnanamani, 2017).

II.3.3.1 Klasifikasi Bakteri *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus dapat diklasifikasikan sebagai berikut (Hill, 1981):

Kingdom : Protozoa

Divisi : Schizomycetes

Kelas : Schizomycetes

Ordo : Eubacteriales

Famili : Micrococcaceae

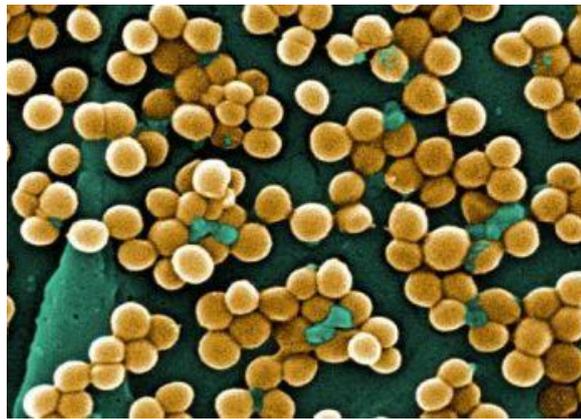
Genus : *Staphylococcus*

Spesies : *Staphylococcus aureus*

II.3.3.2 Morfologi Bakteri *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus merupakan bakteri Gram-positif dengan bentuk bulat. Sel-sel *Staphylococcus aureus* membentuk kelompok dan menyerupai seikat buah anggur bila diamati di bawah mikroskop cahaya

setelah pewarnaan Gram. Diameter sel berkisar 0,5 hingga 0,1 μm . Pada mikroskop elektron transmisi sel menunjukkan dinding sel tebal, membran sitoplasma yang khas dan sitoplasma amorf (Gnanamani, 2017).



Gambar 4. Gambar *Staphylococcus aureus* (Gnanamani, 2017)

Staphylococcus aureus merupakan bakteri aerob dan fakultatif anaerob yang bentuknya cukup besar dan berwarna kuning atau koloni putih pada media agar. Warna kuning dari koloni berasal dari karetonoid yang diproduksi oleh organisme. Hampir semua *Staphylococcus aureus* menghasilkan enzim koagulase dan faktor virulensi yang juga membantu dalam identifikasi organisme. *Staphylococcus aureus* memiliki toleransi terhadap garam, sehingga mampu tumbuh pada media agar garam manitol yang mengandung 7,5% natrium klorida. *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri katalase positif dan oksidase negatif (Gnanamani, 2017).

II.4 Antimikroba

Antimikroba adalah bahan-bahan atau obat-obat yang digunakan untuk memberantas infeksi mikroba pada manusia, hewan ataupun tumbuhan. Antimikroba harus bersifat toksisitas selektif yang artinya

antimikroba tersebut harus bersifat sangat toksik terhadap mikroorganisme penyebab penyakit tetapi relatif tidak toksik terhadap jasad inang atau hospes. Hal ini dapat terjadi karena obat pada reaksi-reaksi biokimia penting dalam sel parasit pengaruhnya lebih unggul daripada pengaruhnya terhadap sel hospes (Djide dan Sartini, 2013).

II.4.1 Mekanisme Kerja Antimikroba

Antimikroba memiliki mekanisme kerja sebagai berikut (Djide dan Sartini, 2013):

II.4.1.1 Pengaktifan Enzim Tertentu

Pengaktifan enzim tertentu merupakan mekanisme umum dari senyawa antiseptika dan desinfektasia, seperti turunan aldehida, amida, karbanilida, etilen-oksida, halogen, senyawa-senyawa merkuri, dan senyawa kuartener.

II.4.1.2 Denaturasi Protein

Turunan alkohol, halogen, dan halogenator, senyawa merkuri, peroksida, turunan fenol, dan senyawa kuartener bekerja sebagai antiseptik dan desinfektan dengan cara denaturasi dan konyugasi protein sel bakteri.

II.4.1.3 Mengubah Permeabilitas Membran Sitoplasma Bakteri

Dengan mengubah permeabilitas membran sitoplasma bakteri, senyawa-senyawa turunan amin dan guanidin serta turunan fenol dan senyawa amonium kuartener dapat menyebabkan bocornya konstituen sel yang essensial sehingga bakteri mengalami kematian.

II.4.1.4 Intekalasi ke dalam DNA

Zat warna seperti turunan trifenilmetan dan turunan akridin, bekerja sebagai antibakteri dengan mengikat secara kuat asam nukleat, menghambat sintesis DNA dan menyebabkan perubahan kerangka mutasi pada sintesis protein.

II.4.1.5 Pembentukan Khelat

Beberapa turunan fenol seperti heksoklorofen dan oksikuinolin dapat membentuk khelat dengan ion Cu dan Fe, kemudian bentuk khelat tersebut masuk ke dalam sel bakteri. Kadar yang tinggi dari ion-ion logam di dalam sel menyebabkan gangguan fungsi enzim-enzim, sehingga mikroorganisme mengalami kematian.

II.4.1.6 Bersifat Sebagai Antimetabolit

Antimikroba memblokir tahap metabolik spesifik mikroba, seperti pada sulfonamida dan trimetropin. Sulfonamida bekerja dengan cara menghambat asam folat sehingga dapat menghambat pertumbuhan sel mikroorganisme.

Sulfonamida secara struktur mirip dengan asam folat, *para amino benzoic acid* (PABA), dan bekerja secara kompetitif menghambat enzim-enzim yang berikatan dengan PABA dan sebagian pteridin sehingga tidak menjadi asam dihidropteroat. Trimetropin bekerja secara kompetitif menghambat enzim dihidrofolat reduktase sehingga tidak mengubah dihidrofolat menjadi tetrahidrofolat.

II.4.1.7 Penghambatan Terhadap Sintesa Dinding Sel

Antimikroba golongan ini dapat menghambat sintesis atau menghambat aktivitas enzim yang dapat merusak dinding sel mikroorganisme, seperti contoh penisilin. Penisilin menghambat *crosslink* antar bagian dinding sel mikroorganisme dengan bekerja sebagai analog D-alanil-D-alanin sehingga tidak berikatan dengan enzim transpeptidase sehingga tidak menimbulkan *crosslink*.

II.4.1.8 Penghambatan Fungsi Permeabilitas Dinding Sel

Antimikroba bekerja secara langsung pada membran sel yang mempengaruhi permeabilitas dan menyebabkan keluarnya senyawa intraseluler mikroorganisme.

II.4.1.9 Penghambatan Sintesis Protein

Antimikroba dalam hal ini mempengaruhi fungsi ribosom pada mikroorganisme yang menyebabkan sintesa protein terhambat. Ada dua ribosom yang berinteraksi dengan antimikroba yaitu ribosom 30S dan ribosom 50S. Antimikroba yang berinteraksi dengan ribosom 30S, yaitu aminoglikosida, tetrasiklin, dan lain-lain. Sedangkan yang berinteraksi dengan ribosom 50S misalnya kloramfenikol, linkomisin, klindamisin, dan eritromisin.

Aminoglikosida menyebabkan akumulasi sintesa protein yang kompleks sehingga salah dalam menerjemahkan tanda mRNA dan menghasilkan polipeptida yang abnormal. Tetrasiklin bekerja menghambat ikatan aminoasil-tRNA dengan ribosom mRNA kompleks.

II.4.1.10 Penghambatan Asam Nukleat

Dalam hal ini antimikroba mempengaruhi metabolisme asam nukleat. Sebagai contoh rifampisin mengikat dan menghambat *DNA-dependent RNA polimerase* yang ada pada bakteri. Kuinolon menghambat DNA girase, dan metronidazol menghambat sintesis DNA.

II.4.2 Efektivitas Antimikroba

Pada kebanyakan infeksi mekanisme pertahanan lokal dan sistemik memainkan peranan dalam menurunkan efek patogenitas mikroorganisme. Keefektivan antimikroba pada pengobatan infeksi dalam klinis tergantung pada kemampuan obat untuk membatasi atau mengurangi mikroorganisme. Bahan atau obat-obat yang bersifat bakterostatik memiliki peranan dalam menghambat replikasi dari mikroorganisme. Sedangkan bahan atau obat-obat yang bersifat bakteriosid memiliki peranan penting dalam membunuh pertumbuhan suatu mikroorganisme (Natsir Djide dan Sartini, 2013).

II.5 Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri dapat dilakukan dalam berbagai cara, yaitu:

II.5.1 Metode Difusi

Uji difusi agar merupakan metode utama untuk menentukan aktivitas antimikroba. Metode ini hanya dapat dilakukan pada bahan uji yang cocok dengan metode difusi. Uji difusi agar bersifat kualitatif, mudah dilakukan, dan sederhana. Metodologi yang digunakan meliputi inokulasi sel bakteri pada nutrient agar dan meletakkan sampel uji pada cawan petri. Setelah itu, cawan diinkubasi selama 1 kali 18-24 jam pada suhu 37°C untuk

bakteri dan 3 kali 18-24 jam untuk jamur, setelah itu bakteri atau jamur akan berkembang biak. Adanya aktivitas antimikroba ditunjukkan dengan tidak adanya pertumbuhan bakteri langsung di bawah sampel uji dan adanya zona bening (Henry, 2007).

II.5.1.1 Cara Cakram (*disc diffusion*)

Metode difusi cakram yang juga dikenal sebagai metode zona penghambatan mungkin yang paling banyak digunakan dari semua metode yang digunakan untuk menguji aktivitas antibakteri. Metode ini menggunakan zat uji dengan jumlah yang sedikit (10–30 μL) dan cawan petri yang berisi 15-25 mL agar. Mikroba uji pada konsentrasi yang ditentukan kemudian disebar ke seluruh permukaan agar. Lempeng kertas (6 atau 8 mm) berisi zat uji dengan volume yang ditentukan kemudian ditempatkan di tengah agar dan cawan diinkubasi selama 24 jam atau lebih. Terdapat area bening untuk sampel uji (zona hambatan) yang mengelilingi disk yang kemudian diukur dan dibandingkan dengan zona untuk antibiotik standar (Balouiri, 2016).

II.5.1.2 Cara Parit (*ditch*)

Metode parit awalnya digunakan untuk menilai resistensi bakteri terhadap sulfonamida. Metode parit memiliki keuntungan sebagai berikut: (1) Mikroorganisme yang berbeda dapat diuji pada satu cawan petri; (2) tiga parit yang berisi antibiotik yang berbeda dapat disertakan di setiap cawan petri; (3) perbandingan langsung dari efek tertentu antibiotik pada setiap organisme dapat dibuat dalam kondisi yang sama; dan (4) tidak

memerlukan waktu inkubasi pada mikroorganisme sehingga waktu yang digunakan tidak lama.

Media agar yang dituangkan ke dalam cawan petri berdiameter 14 cm. Kemudian, setelah mengeras media agar dibuat irisan tiga strip sejajar selebar 1 cm menggunakan pisau bedah steril dan tang membentuk parit. Parit tersebut berisi agen antimikroba yang akan diuji. Mikroorganisme diinokulasikan pada media agar secara garis paralel sepanjang 1,5-2 cm di sudut kanan parit yang berisi antimikroba. Setelah itu, cawan petri diinkubasi pada suhu 37°C selama 12-18 jam dan kemudian zona hambat diukur (Rice, 1950).

II.5.1.3 Cara Sumur (*Cup*)

Metode difusi agar dengan cara sumuran memiliki prosedur yang mirip dengan metode difusi cakram. Setelah mikroorganisme uji diinokulasikan, media agar kemudian dipotong dengan menggunakan pencadangan membentuk silinder. Lubang silinder tersebut digunakan sebagai tempat untuk zat uji atau bahan antimikroba. Kemudian diinkubasi sesuai dengan mikroorganisme uji yang digunakan. Setelah diinkubasi akan tumbuh zona bening atau zona hambatan yang akan diukur untuk menentukan aktivitas antimikroba (Balouiri, 2016).

II.5.2 Metode Dilusi

Metode dilusi adalah metode yang paling tepat untuk penentuan nilai MIC (*Minimum Inhibitor Concentration*), karena metode ini menghasilkan kemungkinan untuk memperkirakan konsentrasi agen

antimikroba yang diuji pada media agar (dilusi agar) atau media cair (makrodilusi atau mikrodilusi). Metode dilusi cair atau agar dapat digunakan untuk mengukur secara kuantitatif aktivitas antimikroba *in vitro* bakteri dan jamur. Nilai MIC yang diperoleh ditetapkan sebagai konsentrasi agen antimikroba terendah yang diuji dan dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme uji. Nilai MIC biasanya dinyatakan dalam mg/mL atau mg/L (Balouiri, 2016).

II.5.2.1 Cara Dilusi Cair (*broth dilution test*)

Dilusi cair makrodilusi atau mikrodilusi adalah salah satu metode pengujian kerentanan antimikroba paling dasar. Prosedurnya melibatkan pengenceran antimikroba dalam media pertumbuhan cair yang dimasukkan dalam tabung dan mengandung volume minimal 2 mL untuk makrodilusi atau dengan menggunakan *wells plate* untuk mikrodilusi karena menggunakan volume yang lebih kecil. Kemudian, setiap tabung atau sumur diinokulasi dengan mikroorganisme uji yang sebelumnya telah diencerkan dan disesuaikan dengan standar MCFarland 0,5. Setelah pencampuran yang baik, tabung yang diinokulasi atau *wells plate* diinkubasi dalam kondisi yang sesuai tergantung pada mikroorganisme uji (Balouiri, 2016).

Metode makrodilusi dan mikrodilusi memiliki kelebihan dan kekurangan masing-masing. Makrodilusi memiliki kekurangan, yaitu metode yang membosankan, pekerjaan manual, risiko kesalahan dalam persiapan larutan antimikroba untuk setiap tes, dan banyak reagen serta

wadah yang digunakan. Sedangkan mikrodilusi memiliki kelebihan yang berbanding terbalik dengan makrodilusi terutama reagen dan wadah yang digunakan (Balouiri, 2016).

Untuk penentuan MIC, pada metode mikrodilusi dapat menguji dan memberikan hasil yang akurat berdasarkan perbedaan pertumbuhan setiap sumur pada *wells plate*. Selain itu, metode kolorimetri juga dapat digunakan sebagai penentu MIC didasarkan pada penggunaan reagen pewarna yang telah dikembangkan seperti garam tetrazolium, (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) atau MTT dan (2,3-bis tetrazolium-hydroxide) atau XTT. Pewarna biru Alamar (resazurin) merupakan indikator yang efektif untuk pertumbuhan dan juga digunakan untuk penentu MIC (Balouiri, 2016).

II.5.2.2 Cara Dilusi Agar

Metode dilusi agar melibatkan berbagai variasi pengenceran konsentrasi antimikroba yang diinginkan. Antimikroba yang telah diencerkan akan dicampur pada media agar beserta mikroorganisme yang diinokulasi. Pengenceran konsentrasi antimikroba biasanya menggunakan kelipatan dua. Titik akhir MIC dinilai sebagai konsentrasi agen antimikroba terendah yang menghambat pertumbuhan dalam kondisi inkubasi yang sesuai.

Teknik ini cocok untuk pengujian efektivitas antibakteri dan antijamur. Jika beberapa isolat sedang diuji terhadap senyawa tunggal atau jika ekstrak yang diuji menutupi deteksi pertumbuhan mikroba dalam media

cair dengan menggunakan pewarnaan, metode pengenceran agar lebih disukai daripada pengenceran kaldu untuk penentuan MIC. Dilusi agar sering direkomendasikan pada pengujian bakteri yang memiliki nutrisi khusus seperti bakteri anaerob dan *helicobacter* (Balouiri, 2016).

II.5.3 Metode Bioautografi

Pada tahun 1946, *Goodall* dan *Levi* menggabungkan metode kromatografi kertas dengan kontak bioautografi untuk mendeteksi perbedaan penisilin. Setelah itu, *Fischer* dan *Lautner* memperkenalkan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) di bidang yang sama. Teknik ini menggabungkan kromatografi lapis tipis dengan metode deteksi biologis dan kimiawi. Metode KLT bioautografi banyak digunakan untuk pengujian pada ekstrak organik terutama ekstrak tanaman untuk aktivitas antibakteri atau antijamur (Balouiri, 2016).

II.5.3.1 Cara Bioautografi Langsung

Bioautografi langsung adalah metode yang paling banyak diterapkan di antara tiga metode lainnya. Pelat kromatogram yang telah dilusi disemprot dengan suspensi mikroba. Kemudian, bioautogram diinkubasi pada suhu 25°C selama 48 jam dalam kondisi lembab. Untuk penampakan pertumbuhan mikroba, digunakan garam tetrazolium sebagai pewarna. Garam tetrazolium akan mengalami perubahan menjadi sangat berwarna oleh dehidrogenase sel hidup. Garam tetrazolium disemprotkan ke plat kromatogram dan diinkubasi kembali pada suhu 25°C selama 24 jam atau pada suhu 37°C selama 3–4 jam (Balouiri, 2016).

II.5.3.2 Cara Bioautografi Kontak

Metode bioautografi kontak merupakan metode yang paling jarang digunakan. Metode bioautografi kontak melibatkan transfer agen antimikroba menggunakan cara difusi dari kromatogram (Kromatografi Kertas atau KLT) ke media agar yang sebelumnya diinokulasi dengan mikroorganisme yang diuji. Setelah beberapa menit atau jam berdifusi, kromatogramnya dilepas dan media agar diinkubasi. Penghambatan pertumbuhan zona muncul di tempat di mana senyawa antimikroba kontak dengan lapisan agar (Balouiri, 2016).

II.5.3.3 Cara Bioautografi Pencelupan

Bioautografi celup merupakan metode gabungan dari kedua metode sebelumnya. Pelat KLT dicelupkan pada media agar yang masih dalam bentuk cair. Untuk memungkinkan difusi yang baik dari senyawa antimikroba yang diuji ke dalam media agar, pelat KLT dapat disimpan terlebih dahulu pada suhu rendah selama beberapa jam sebelum inkubasi. Kemudian inkubasi dalam kondisi yang sesuai tergantung pada mikroorganisme uji. Untuk memperjelas hasil zona penghambatan dapat dilakukan pewarnaan menggunakan dengan pewarna tetrazolium. Seperti metode bioautografi langsung, metode ini dapat diterapkan pada semua mikroorganisme seperti *Candida albicans* dan jamur. Hal ini menghasilkan zona hambatan yang bagus dan tidak sensitive terhadap kontaminasi (Balouiri, 2016).

II.6 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis adalah metode yang paling sederhana dari semua metode kromatografi yang banyak digunakan. Terdiri dari bejana yang berisi eluen (fase gerak) serta tutupnya dan pelat berlapis (fase diam) yang diperlukan untuk melakukan pemisahan dan analisis kualitatif atau semi kuantitatif. Prinsip dari kromatografi lapis tipis yaitu adanya perbedaan sifat kimia dan sifat fisik dari senyawa seperti kecenderungan molekul untuk larut dalam cairan (kelarutan), kecenderungan molekul untuk menguap dan kecenderungan molekul untuk melekat pada permukaan (penjerapan) (Sherma and Fried, 2003).

Migrasi diferensial atau gerakan suatu senyawa pada kolom bergantung pada hasil berbagai tingkat afinitas dari komponen campuran untuk fase diam dan fase gerak. Kromatografi lapis tipis melibatkan sifat fase diam dan fase gerak yang tepat. Fase diam dapat berupa lapisan penjerap yang terdiri dari serbuk halus yang berfungsi sebagai penjerap, penyangga atau lapisan zat cair. Fase gerak dapat berupa sebuah pelarut atau campuran pelarut (Sherma and Fried, 2003).

Fase diam yang berupa pelat dapat berpendar pada sinar UV 254 nm, contohnya silica gel F₂₅₄ karena adanya indikator fluoresensi. Indikator fluoresensi tersebut dapat membantu menampakkan bercak senyawa saat diamati di bawah sinar UV. Penampakkan bercak dapat terjadi pada sebagian senyawa aromatik dan senyawa yang memiliki ikatan terkonjugasi serta beberapa senyawa tak jenuh. Hal ini dikarenakan sinar UV akan mengeksitasi dari tingkat energi rendah ke tingkat energi tinggi

sambil melepaskan energi pelarut dan kembali ke keadaan semula. Selain itu, ada beberapa senyawa yang membutuhkan aplikasi reagen pendeteksi dengan penyemprotan atau pencelupan diperlukan untuk menghasilkan warna atau fluoresensi (Sherma and Fried, 2003).

Identifikasi senyawa yang terpisah pada KLT didasarkan pada perbandingan R_f (*Retardation factor*) yang merupakan jarak tempuh senyawa terhadap jarak keseluruhan yang ditempuh eluen, yaitu :

$$R_f = \frac{\text{Jarak Tempuh Noda}}{\text{Jarak Tempuh Eluen}}$$

R_f bernilai 0,00 – 1,00 dan hanya dapat menggunakan dua desimal. Banyak faktor yang dapat menentukan nilai R_f , diantaranya metode preparasi sampel sebelum KLT, sifat dan ukuran lapisan fase diam, arah aliran fase gerak, volume dan komposisi fase gerak, kondisi kesetimbangan, serta kelembapan (Sastrohamidjojo, 1991).