

**UJI BIOAKTIVITAS EKSTRAK DAUN PALIASA *Kleinhovia hospita* L.  
TERHADAP BAKTERI *Salmonella typhi* DENGAN METODE KLT  
BIOAUTOGRAFI**



**KHAERUN NIZA**

**H041201010**



**PROGRAM STUDI BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2024**

**UJI BIOAKTIVITAS EKSTRAK DAUN PALIASA *Kleinhovia hospita* L.  
TERHADAP BAKTERI *Salmonella typhi* DENGAN METODE KLT  
BIOAUTOGRAFI**

**KHAERUN NIZA**

**H041201010**



**PROGRAM STUDI BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2024**

**UJI BIOAKTIVITAS EKSTRAK DAUN PALIASA *Kleinhovia hospita* L.  
TERHADAP BAKTERI *Salmonella typhi* DENGAN METODE KLT  
BIOAUTOGRAFI**

**KHAERUN NIZA**

**H041201010**

Skripsi

sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar sarjana

Program Studi Biologi

pada

**PROGRAM STUDI DEPARTEMEN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2024**

## SKRIPSI

UJI BIOAKTIVITAS EKSTRAK DAUN PALIASA *Kleinhovia hospita* L.  
TERHADAP BAKTERI *Salmonella typhi* DENGAN METODE KLT  
BIOAUTOGRAFI

KHAERUN NIZA

H041201010

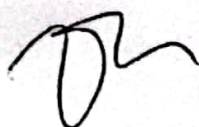
Skripsi,

telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Sarjana pada 21 Agustus 2024  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan pada



Program Studi Biologi  
Departemen Biologi  
Fakultas Matematikadan Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Hasanuddin  
Makassar

Mengesahkan:  
Pembimbing utama,



Dr. Zaraswati Dwyana, M.Si  
NIP. 196512091990082001

Mengetahui:  
Ketua Program Studi,



Dr. Magdalena Litaay, M.Sc.  
NIP. 196409291989032002

iv

## PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, skripsi berjudul "Uji Bioaktivitas Ekstrak Daun Paliasa *Kleinhovia hospita* L. Terhadap Bakteri *Salmonella typhi* Dengan Metode KLT Bioautografi" adalah benar karya saya dengan arahan dari pembimbing (Dr. Zaraswati Dwyana, M.Si). Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka skripsi ini. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan skripsi ini adalah karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut berdasarkan aturan yang berlaku.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta (hak ekonomis) dari karya tulis saya berupa skripsi ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, 21 Agustus 2024

  
Khaerun Niza  
H041201010

## UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah Subhanahu Wa Ta'ala yang telah melimpahkan berkat dan rahmat-Nya sehingga, penulis dapat menyelesaikan tugas skripsi dengan baik. Shalawat dan salam penulis haturkan kepada Rasulullah Muhammad Shallallahu 'Alahi Wasallam yang menjadi suri tauladan bagi seluruh umat Islam. Pertama-tama penulis mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada kedua orang tua tercinta bapak Untung dan mama Sugiyati serta kakak tersayang drg. Al Maulidia S.Kg yang telah memberikan do'a tulus, motivasi, cinta dan kasih sayang, dukungan moril dan materil serta kepercayaan bahkan disaat penulis meragukan kemampuan diri sendiri. Semoga Allah SWT senantiasa memberikan kemudahan dan pertolongan, kesehatan, keberkahan, nikmat iman serta karunia di dunia maupun akhirat. Pada kesempatan ini pula, dengan segala kerendahan hati Penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Ibu Dr. Magdalena Litaay, M.Sc. selaku ketua departemen program studi biologi Universitas Hasanuddin.
2. Ibu Dr. Zaraswati Dwyana, M.Si. selaku dosen pembimbing skripsi yang senantiasa meluangkan waktu dan tenaga untuk memberikan bimbingan dan arahan, sehingga penulis merasa bersemangat menyelesaikan skripsi.
3. Ibu Dr. Zohra Hasyim, M.Si. sebagai pembimbing akademik yang telah memberikan arahan dan dukungan, sehingga penulis dapat menyelesaikan proses perkuliahan dengan baik.
4. Bapak Prof. Dr. Fahrudin, M.Si atas kesempatan untuk menggunakan fasilitas dan peralatan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas MIPA Unhas, Bapak Prof. Dr. Gemini Alam, M.Si., Apt. atas kesempatan untuk menggunakan fasilitas dan peralatan di Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi Unhas, Ibu Prof. Dr. Elly Wahyudin, DEA., Apt. atas kesempatan untuk menggunakan fasilitas dan peralatan di Laboratorium Biofarmaka Fakultas Farmasi Unhas.
5. Fuad Gani S.Si selaku laboran Laboratorium Mikrobiologi Fakultas MIPA Unhas, Abdi, S.Si selaku laboran Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi Unhas dan Dewi Primayanti Laela, S.Si selaku laboran Laboratorium Biofarmaka Fakultas Farmasi Unhas atas ilmu dan bantuan selama penelitian.
6. Seluruh dosen dan staf akademik Departemen Biologi, Fakultas MIPA Unhas atas ilmu dan dedikasinya selama masa perkuliahan hingga penyelesaian tugas akhir.
7. Nurul Fatimah sebagai sahabat seperjuangan yang setia kebersamaan sejak 2014 sampai saat ini. Terima kasih atas segala kebaikan dan ketulusan yang telah diberikan.
8. Teman KKN Tematik Gelombang 110 Desa Baroko, Kecamatan Baroko, Kabupaten Enrekang. Sarwana, Nunu Indira Saputri, Nur Fadilah, Salsabila Ramadhani, Nabila Firyal Hipan dan Stevie Stefano Prins atas kebersamaan dan momen indah yang dihadirkan kepada penulis.

9. Seluruh teman-teman seperjuangan Biologi angkatan 2020 atas bantuan, ilmu dan kerjasama selama perkuliahan hingga penyusunan tugas akhir.
10. Orang baik yang dipertemukan oleh Allah secara tidak sengaja yang membantu penulis dalam masa penelitian dan semua pihak lainnya yang tidak bisa disebutkan satu-persatu.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan karena pengetahuan dan pengalaman penulis yang masih sangat terbatas. Penulis sangat mengharapkan kritik dan saran yang bersifat konstruktif dari berbagai pihak untuk penyempurnaan penulisan selanjutnya. Penulis berharap dengan adanya skripsi ini, dapat menambah wawasan, pengetahuan serta pengalaman bagi penulis maupun pembaca.

Makassar, 21 Agustus 2024

Khaerun Niza  
H041201010



## ABSTRAK

**KHAERUN NIZA. Uji Bioaktivitas Ekstrak Daun Paliasa *Kleinhovia hospita* L. Terhadap Bakteri *Salmonella typhi* Dengan Metode KLT Bioautografi** (dibimbing oleh Dr. Zaraswati Dwyana, M.Si).

Demam tifoid telah banyak terjadi di negara berkembang seperti Indonesia yang disebabkan oleh konsumsi makanan dan minuman yang terkontaminasi *Salmonella typhi*. Pengobatan awal menggunakan antibiotik secara tidak tepat dapat menyebabkan resistensi antibiotik. Di Kecamatan Kajang Kabupaten Bulukumba terdapat kepercayaan bahwa penyakit demam tifoid dapat diobati dengan menggunakan daun Paliasa (*Kleinhovia hospita* L.). Penelitian bertujuan untuk mengidentifikasi senyawa bioaktif dalam ekstrak daun Paliasa dan mengkaji potensinya sebagai antibakteri terhadap *Salmonella typhi* melalui uji KLT (Kromatografi Lapis Tipis) Bioautografi. Penelitian ini meliputi tiga tahap yaitu 1). ekstraksi maserasi, 2). identifikasi senyawa secara kualitatif menggunakan uji KLT, 3). uji bioaktivitas antibakteri menggunakan uji KLT Bioautografi. Proses ekstraksi menghasilkan ekstrak kental 9 gram dengan nilai persen rendemen 12%. Hasil uji KLT menunjukkan adanya kandungan flavonoid, alkaloid, tanin, steroid, terpenoid, dan saponin pada ekstrak. Uji KLT Bioautografi menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun Paliasa menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *Salmonella typhi* pada Rf 0,45 yang tridentifikasi secara kualitatif sebagai senyawa steroid.

Kata kunci: antibakteri, KLT bioautografi, paliasa, tifoid



## ABSTRACT

**KHAERUN NIZA. Bioactivity Test of Paliasa *Kleinhovia hospita* L. Leaf Extract against *Salmonella typhi* Bacteria by KLT Bioautography Method** (supervised by Dr. Zaraswati Dwyana, M.Si).

Typhoid fever has occurred in many developing countries such as Indonesia, caused by consuming contaminated food and drinks *Salmonella typhi*. Initial treatment using antibiotics incorrectly can cause antibiotic resistance. In Kajang District, Bulukumba Regency, there is a belief that typhoid fever can be treated using Paliasa leaves (*Kleinhovia hospita* L.). The research aims to identify bioactive compounds in Paliasa leaf extract and assess its potential as an antibacterial against *Salmonella typhi* through the TLC (Thin Layer Chromatography) Bioautography test. This research includes three stages, namely 1). maceration extraction, 2). qualitative identification of compounds using the TLC test, 3). antibacterial bioactivity test using the TLC Bioautography test. The extraction process produces a thick extract of 9 grams with a percent yield value of 12%. The TLC test results showed that there were flavonoids, alkaloids, tannins, steroids, terpenoids and saponins in the extract. The Bioautography TLC test showed that the methanol extract of Paliasa leaves showed antibacterial activity against *Salmonella typhi* at Rf 0.45 which was qualitatively identified as a steroid compound.

Key words: antibacterial, TLC bioautography, paliasa, typhoid

## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
HALAMAN JUDUL.....	i
PERNYATAAN PENGAJUAN SKRIPSI.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI .....	iv
UCAPAN TERIMA KASIH.....	v
ABSTRAK.....	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN .....	xiii
BAB I. PENDAHULUAN .....	1
I.1 Latar belakang.....	1
I.2 Teori.....	2
I.2.1 Klasifikasi Tumbuhan Paliasa <i>Kleinovhia hospita</i> L. ....	2
I.2.2 Morfologi Tumbuhan Paliasa <i>Kleinovhia hospita</i> L. ....	2
I.2.3 Kandungan Senyawa Metabolit Sekunder .....	3
I.2.4 Bioaktivitas sebagai Antibakteri .....	3
I.2.5 Klasifikasi Bakteri <i>Salmonella typhi</i> .....	3
I.2.6 Karakteristik Bakteri <i>Salmonella typhi</i> .....	4
I.2.7 Patogenitas Bakteri <i>Salmonella typhi</i> .....	5
I.2.8 Senyawa Antibiotik.....	6
I.2.9 Mekanisme Kerja Senyawa Antibiotik .....	6
I.2.10 Resistensi Antibiotik.....	6
I.2.11 Metode Uji KLT Bioautografi .....	8
1.1. Tujuan Penelitian .....	10
1.2. Manfaat Penelitian .....	10
1.3. Tempat dan Waktu.....	10
BAB II. METODE PENELITIAN.....	11
II.1 Alat.....	11
II.2 Bahan.....	11
II.3 Metode Kerja .....	11
II.3.1 Pengambilan Sampel.....	11
II.3.2 Pembuatan Simplisia .....	11
II.3.3 Pembuatan Ekstrak.....	12
II.3.4 Sterilisasi Alat dan Media.....	12
II.3.6 Penyediaan Bakteri Uji.....	13
II.3.7 Pemisahan Komponen Kimia secara KLT .....	13

II.3.8 Identifikasi Senyawa secara Kualitatif .....	14
II.3.9 Pengujian Antibakteri secara KLT Bioautografi .....	14
II.3.10 Analisis Data.....	14
BAB III. HASIL DAN PEMBAHASAN .....	15
III.1 Hasil Penelitian .....	15
III.1.1 Hasil Ekstrak Daun Paliasa <i>Kleinhovia hospita</i> L. ....	15
III.1.2 Hasil Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Ekstrak Metanol Daun Paliasa <i>Kleinhovia hospita</i> L.....	15
III.1.3 Hasil Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Ekstrak Metanol Daun Paliasa <i>Kleinhovia hospita</i> L. secara Kualitatif .....	16
III.1.4 Hasil Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Bioautografi Ekstrak Metanol Daun Paliasa <i>Kleinhovia hospita</i> L.....	17
BAB IV. PENUTUP .....	21
IV.1 Kesimpulan .....	21
IV.2 Saran .....	21
DAFTAR PUSTAKA.....	22
LAMPIRAN .....	23

**DAFTAR GAMBAR**

<b>Nomor urut</b>	<b>Halaman</b>
Gambar 1. Tumbuhan Paliasa <i>Kleinhovia hospita</i> L.....	1
Gambar 2. Struktur Sel Bakteri <i>Salmonella typhi</i> .....	4
Gambar 3. Mekanisme siklus infeksi bakteri <i>Salmonella</i> .....	5
Gambar 4. Skema Mekanisme Kerja Antibakteri.....	6
Gambar 5. Mekanisme Resistensi Antibiotik <i>Salmonella spp.</i> .....	7
Gambar 6. Skema Uji Metode KLT Bioautografi. ....	8
Gambar 7. Sampel daun Paliasa .....	15
Gambar 8. Hasil uji klt Bioautografi ekstrak metanol daun Paliasa terhadap bakteri <i>Salmonella typhi</i> (U1).....	17
Gambar 9. Hasil uji klt Bioautografi ekstrak metanol daun Paliasa terhadap bakteri <i>Salmonella typhi</i> (U2).....	17

**DAFTAR TABEL**

<b>Nomor urut</b>	<b>Halaman</b>
Tabel 1. Hasil Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Ekstrak Metanol Daun Paliasa <i>Kleinhovia hospita</i> L. ....	15
Tabel 2. Hasil Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Ekstrak Metanol Daun Paliasa <i>Kleinhovia hospita</i> L. secara Kualitatif .....	15

**DAFTAR LAMPIRAN**

<b>Nomor urut</b>	<b>Halaman</b>
Lampiran 1. Singakatan dan Lambang .....	26
Lampiran 2. Lokasi Pengambilan Sampel.....	26
Lampiran 3. Alur Penelitian.....	27
Lampiran 4. Dokumentasi Penelitian .....	30

# BAB I

## PENDAHULUAN

### I.1 Latar Belakang

Demam tifoid adalah suatu penyakit yang sudah banyak diderita oleh masyarakat dan sudah tersebar di seluruh dunia. Sekitar 20 juta kasus baru demam tifoid terjadi setiap tahunnya secara global (Bhumbla et al., 2022). Kasus penyakit ini menjadi masalah kesehatan masyarakat yang mendominasi negara-negara berkembang salah satunya Indonesia. Hal tersebut, dipengaruhi oleh sanitasi lingkungan buruk dan kondisi iklim yang tergolong tropis. Kepadatan penduduk dan permukiman yang kumuh serta faktor iklim, seperti kelembaban, curah hujan dan kecepatan angin berpengaruh secara nyata dalam peningkatan kasus demam tifoid di Indonesia (Asadi et al., 2022). Kondisi tersebut, merupakan faktor pendukung berkembang biaknya spesies bakteri *Salmonella typhi* penyebab demam tifoid. Demam tifoid di Indonesia termasuk kategori penyakit berstatus endemik. Menurut data Kementerian Kesehatan RI menyebutkan prevalensi demam tifoid di Indonesia sekitar 350-810 per 100.000 penduduk, berarti setiap tahunnya sekitar (500/100.000 penduduk) dengan angka kematian 0,6–5% (Sahani et al., 2020).

Demam tifoid terjadi akibat mengonsumsi makanan dan minuman yang terkontaminasi oleh bakteri *Enterobacteriaceae* yang umumnya bersifat patogen. Bakteri yang dimaksud, yaitu bakteri dari genus *Salmonella*, spesies *Salmonella enterica* dengan serotipe *typhi* disebut dengan bakteri *Salmonella typhi*. Bakteri yang masuk ke dalam saluran pencernaan dapat menginfeksi manusia. Infeksi *Salmonella typhi* yang akut dapat menjadi demam tifoid (Crump, 2019). Demam tifoid menimbulkan gejala yang bervariasi terhadap penderitanya. Menurut penelitian Stanaway et al. (2019) bahwa penderita akan mengalami demam ringan, malaise, batuk kering, diare, sembelit dan nyeri perut yang berlangsung selama 3-4 minggu. Namun, jika tidak diobati dapat mengakibatkan komplikasi, yaitu pendarahan gastrointestinal, perforasi usus, dan ensefalopati tifoid. Bahkan dapat menimbulkan kasus kematian dengan persentase sebanyak 10-30% (Bhumbla et al., 2022).

Pemberian antibiotik merupakan upaya awal dalam penanganan demam tifoid untuk mencegah komplikasi yang berpotensi fatal. Namun, penggunaan antibiotik secara tidak tepat dapat menimbulkan dampak negatif, yaitu meningkatnya resistensi antibiotik dan munculnya penyakit kardiovaskular yang berpotensi dalam mengakibatkan peristiwa kematian (López & Quirós, 2019). *Multiple Drug Resistant (MDR)* telah terjadi pada strain bakteri *Salmonella typhi* yang menunjukkan resistensi terhadap antibiotik lini pertama penanganan demam tifoid, seperti *kloramfenikol*, *ko-trimoksazol (trimethoprim-sulfamethoxazole)*, dan *ampicilin* (Masuet-Aumatell & Atouguia, 2021). Alternatif pengganti beberapa antibiotik tersebut sangat dibutuhkan untuk mengobati demam tifoid.

Tumbuhan herbal dapat menjadi alternatif pengobatan penyakit, karena minim efek samping, sehingga lebih aman jika digunakan. Masyarakat di daerah Kecamatan Kajang, Kabupaten Bulukumba, biasanya menangani penyakit demam tifoid dengan memanfaatkan tumbuhan Paliasa *Kleinhovia hospita* L. sebagai obat. Mereka percaya bahwa mengonsumsi air hasil rebusan daun Paliasa bisa menyembuhkan penyakit demam tifoid yang diderita. Penelitian Desiana et al. (2018); Eria (2022) mendukung hal



ini, dalam penelitian tersebut, dijelaskan bahwa tumbuhan ini memiliki aktivitas antipiretik yang optimal pada dosis 200 mg/gr BB untuk menurunkan demam.

Daun Paliasa berpotensi sebagai obat demam tifoid karena, memiliki senyawa metabolit sekunder yang bisa menghambat pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi* sebagai penyebab demam tifoid. Senyawa bioaktif yang terkandung dalam daun Paliasa diantaranya, yaitu alkaloid, flavonoid dan saponin (Sulistijono et al., 2019). Beberapa senyawa tersebut, memiliki potensi menghambat pertumbuhan bakteri. Sehingga, perlu dilakukan uji bioaktivitas antibakteri daun Paliasa terhadap bakteri *Salmonella typhi*. Metode pengujian yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah KLT Bioautografi. Metode ini dipilih karena pertimbangan khusus, dengan menggunakan metode ini, tidak hanya memungkinkan kita untuk mengkaji potensi daya hambat senyawa bioaktif dalam daun Paliasa, tetapi juga memberikan kemampuan untuk mengidentifikasi senyawa spesifik yang efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi*.

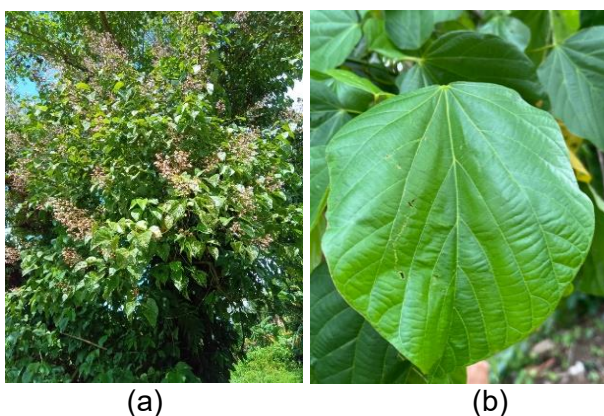
## I.2 Teori

### I.2.1 Klasifikasi Tumbuhan Paliasa *Kleinhovia hospita* L.

Klasifikasi tumbuhan *Kleinhovia hospita* L. berdasarkan data dari Integrate Taksonomi Information System (ITIS) 2024 sebagai berikut :

Regnum	: Plantae
Filum	: Tracheophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Malvales
Famili	: Malvaceae
Genus	: <i>Kleinhovia</i>
Spesies	: <i>Kleinhovia hospita</i> L.

### I.2.2 Morfologi Tumbuhan Paliasa *Kleinhovia hospita* L.



**Gambar 1.** Tumbuhan Paliasa *Kleinhovia hospita* L. (a) pohon dan (b) daun (Dokumentasi pribadi)

Tumbuhan *Kleinhovia hospita* L. tumbuh sebagai semak atau pohon kecil dengan ketinggian mencapai 5 hingga 20 meter. Batangnya kadang-kadang memiliki alur

dan berwarna coklat tua. Mahkota bunganya agak membulat dan tidak lebar. Daun tunggal tersebar atau berselang-seling, dengan tangkai yang panjang dan helaian daun berbentuk hati. Panjang daun berkisar antara 4,5 hingga 27 cm, dan lebarnya antara 3 hingga 24 cm. Bunganya berwarna merah muda yang tegak dan tidak terlalu jelas, serta malai yang panjang. Braktea bunganya berbentuk lonjong, dan perianthiumnya berwarna merah. Buahnya berbentuk persegi atau kotak, terbagi menjadi lima alur, dan berwarna merah jambu ketika segar, tetapi berubah menjadi coklat kering saat matang (Arifa, 2021).

### I.2.3 Kandungan Senyawa Metabolit Sekunder

Tumbuhan *Kleinhovia hospita* L. mengandung berbagai senyawa fitokimia yang bermanfaat bagi kesehatan. Dari akar hingga daunnya, terkandung beberapa senyawa diantaranya, yaitu sianogen, alkaloid, proanthocyanin, sianidin, flavanol, kaempferol, kuersetin, dan saponin (Hasanuddin dan Andini 2017; (Manuputty et al., 2022). Penelitian lain menunjukkan bahwa tanaman ini memiliki kandungan senyawa antioksidan yang tinggi, termasuk fenol, flavonoid, polifenol, kaempferol, quercetin, dan senyawa sianogenik (Hidayat et al., 2023). Khusus pada bagian daun, terdapat alkaloid sebesar 2,83%, flavonoid sebesar 19,78% dan saponin sebesar 14,23% (Yunita et al., 2019).

### I.2.4 Bioaktivitas sebagai Antibakteri

Penelitian yang dilakukan Magvirah et al. (2019) bahwa ekstrak etanol daun *Kleinhovia hospita* L. pada konsentrasi 10 g/L, 30 g/L, dan 100 g/L, mampu menghambat pertumbuhan bakteri gram positif, yaitu *Staphylococcus aureus* yang ditandai dengan terbentuknya zona hambat di sekitar cakram. Selain mampu menghambat bakteri *Staphylococcus aureus* tumbuhan ini juga mampu menghambat pertumbuhan bakteri gram negatif, yaitu *Eschericia coli* dan *Salmonella typhosa*. Hal tersebut, berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Yunus & Malik (2019) bahwa ekstrak etanol daun *Kleinhovia hospita* L. memiliki kemampuan daya hambat minimum untuk bakteri *Eschericia coli* pada konsentrasi 35% sementara kemampuan daya hambat minimum untuk bakteri *Salmonella typhosa* pada konsentrasi 55%.

### I.2.5 Klasifikasi Bakteri *Salmonella typhi*

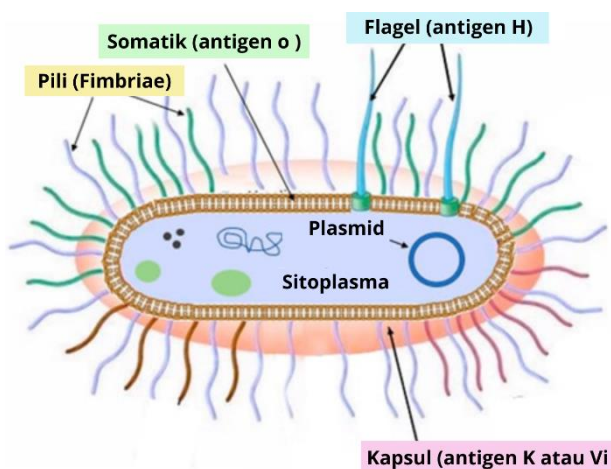
Menurut Vilela & Falcão (2024) bakteri *Salmonella typhi* dapat diklasifikasikan berdasarkan sebagai berikut :

Kingdom	: Bacteria
Filum	: Proteobacteria
Kelas	: Gammaprotobacteria
Ordo	: Enterobacteriales
Famili	: Enterobacteriaceae
Genus	: <i>Salmonella</i>
Spesies	: <i>Salmonella enterica</i>
Subspesies	: <i>Salmonella typhi</i>

## I.2.6 Karakteristik Bakteri *Salmonella typhi*

Bakteri *Salmonella typhi* merupakan bakteri basil gram negatif, bersifat anaerob fakultatif dan memiliki flagel sehingga aktif bergerak (Dudi, 2019). *Salmonella typhi* adalah salah satu anggota famili *Enterobacteriaceae*. Organisme tersebut adalah negatif terhadap uji pewarnaan dan oksidase gram dan tergolong motil (karena adanya flagela *peritrichous*), berbentuk batang, non-spora memproduksi dan anaerob fakultatif. Genus *Salmonella* berukuran sekitar  $2-3 \times 0,4-0,6 \mu\text{m}$ . Gns *Salmonella* biasanya menghasilkan hidrogen sulfida, memecah D-glukosa menjadi menghasilkan hidrogen dan karbon dioksida, sedangkan Nitrat direduksi menjadi nitrit (Oludairo et al., 2022). Bakteri ini dapat hidup pada kondisi lingkungan dengan tingkat pH 6-8 dengan suhu  $15-41^{\circ}\text{C}$  dan tumbuh secara optimal pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$ . Bakteri ini akan mati pada pemanasan  $54,4^{\circ}\text{C}$  selama satu jam dan suhu  $60^{\circ}\text{C}$  dengan interval waktu selama 15–20 menit (Kasim dan Vivien, 2020).

Bakteri *Salmonella typhi* menghasilkan endotoksin yang memiliki peran dalam patogenitas infeksi gram negatif. Endotoksin adalah bagian besar dari membran luar bakteri gram negatif. Endotoksin berperan sebagai mediator yang kuat dari berbagai aspek patofisiologi pada manusia terutama pada saluran pencernaan maka dari itu juga disebut dengan endotoksin. Endotoksin adalah kompleks dengan berat molekul tinggi dari lipopolisakarida (LPS) yang merupakan komponen utama dinding sel bakteri dan merupakan zat bersifat toksik yang tahan terhadap panas dan jika terjadi kerusakan selubung sel pada bakteri gram negatif maka pada saat itu endotoksin ini akan dikeluarkan. Secara kimia lipopolisakarida (LPS) terdiri atas polisakarida hidrofilik yang terikat secara kovalen dengan lipid hidrofobik yang berperan dalam mengikat molekul di membran luar (Chatterjee et al., 2023).



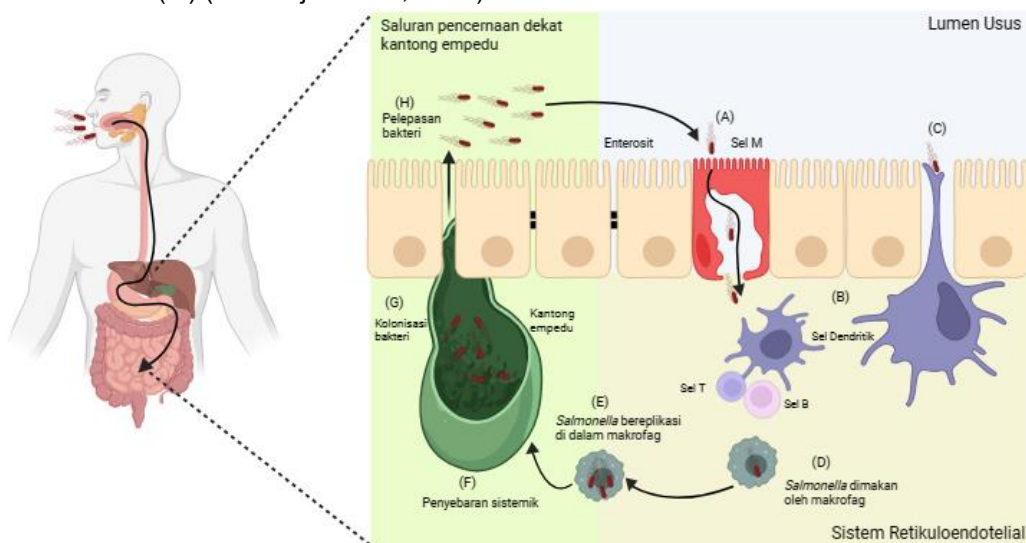
**Gambar 2.** Struktur Sel Bakteri *Salmonella typhi*  
(Teklemariam et al., 2023)

Bakteri *Salmonella typhi* memiliki tiga jenis struktur yang menjadi faktor penentu antigenik diantaranya, yaitu antigen H (flagellar), antigen K (kapsul) dan antigen O (somatik). Beberapa serotipe bakteri *Salmonella* mengekspresikan satu atau lebih tipe antigen O. Antigen O adalah bentuk lipopolisakarida tahan panas yang ditemukan pada

membran luar. Antigen H yang diwakili oleh flagela bakteri merangsang respon imun inang. Kebanyakan serovar bakteri *Salmonella* mengandung dua wilayah genom tertentu yang mengkode sintesis flagela. Bakteri ini memiliki kemampuan unik untuk mengekspresikan hanya satu dari protein-protein ini pada suatu waktu, itulah sebabnya disebut bakteri difasik (fase I dan II). Antigen fase I menjelaskan karakter imunologis suatu serotipe, sedangkan antigen fase II umum terjadi pada banyak serotipe. Antigen K merupakan polisakarida yang sensitif terhadap panas dan menempel pada permukaan kapsul bakteri. Antigen ini adalah antigen paling sedikit jumlahnya diantara semua serotipe (Teklemariam et al., 2023).

### I.2.7 Patogenitas Bakteri *Salmonella typhi*

Bakteri *Salmonella typhi* yang mengontaminasi makanan dan minuman akan masuk ke dalam tubuh melalui saluran pencernaan. Bakteri ini beradaptasi dengan pH asam lambung karena memiliki kemampuan mentoleransi sifat asam dengan baik disebut phoPQ. Selanjutnya, bakteri ini menuju bagian usus dan menyebar di area sistem imun inang seperti enzim pencernaan, garam empedu, IgA sekretori dan peptida antimikroba (AMP). Kemudian melintasi lapisan lendir usus untuk mencapai jaringan epitel bagian bawah. Pada bagian usus kecil, bakteri *Salmonella typhi* akan diserap oleh sel mikrofold (M) (Chatterjee et al., 2023).



**Gambar 3.** Mekanisme siklus infeksi bakteri *Salmonella* (Chatterjee et al., 2023)

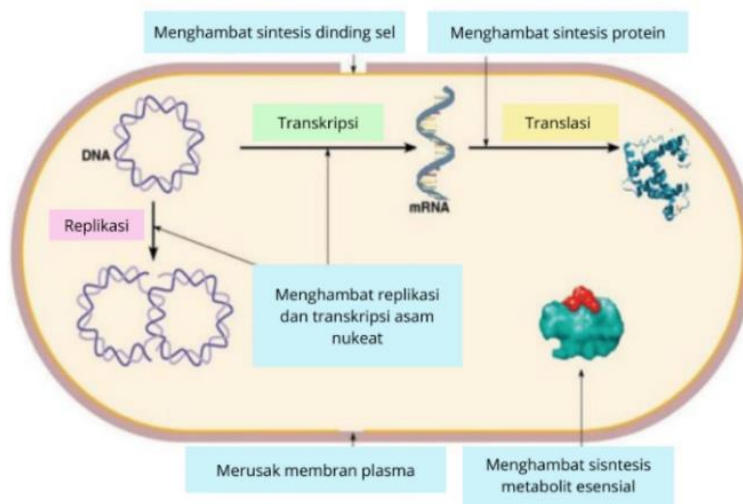
*Keterangan : Pertama-tama (A) Salmonella memasuki sel M, (B) terperangkap ke sel limfoid (T dan B) (C) diambil oleh sel dendritik, dendrit memanjang melalui penghalang epitel usus. (D) Setelah melintasi epitel, serotipe Salmonella yang berhubungan dengan penyakit sistemik memasuki makrofag usus dan (E) mengalami replikasi intramakrofag dan (F) menyebar ke seluruh sistem retikuloendotelial, menyebabkan infeksi sistemik. (G) Kolonisasi lebih lanjut pada kandung empedu menyebabkan (H) pengangkutan kronis dan pelepasan bakteri melalui mekanisme ini. Warna latar belakang hijau menggambarkan saluran pencernaan di dekat bukaan kandung empedu, dan latar belakang kuning menggambarkan area usus saluran pencernaan.*

## I.2.8 Senyawa Antibiotik

Antibiotik berperan dalam penghancuran sel bakteri dengan cara mencegah proses reproduksi sel, mengganggu fungsi fisiologis ataupun proses seluler yang diperlukan di oleh sel. Senyawa antimikroba secara *in vitro* dapat dikelompokkan menjadi dua kategori, yaitu bakterisidal dan bakteristatik. Bakterisidal dianggap mampu membunuh bakteri sementara bakteristatik dianggap hanya mampu menghambat pertumbuhan bakteri (Aula et al. 2023). Senyawa antimikroba yang sifat bakterisidal menargetkan kerusakan pada bagian dinding sel bakteri sementara sifat bakteristatik mengganggu jalannya proses sintesis protein pada bakteri (Sachin dan Parag, 2021).

## I.2.9 Mekanisme Kerja Senyawa Antibiotik

Mekanisme senyawa antibiotik dalam menghambat pertumbuhan dan membunuh bakteri adalah mengganggu proses metabolismenya dengan cara, yaitu menghambat proses sintesis dinding sel, menghambat proses sintesis protein, mengganggu fungsi fisiologis membran sel, dan menghambat proses sintesis asam nukleat (Pancu et al., 2021).



**Gambar 4.** Skema Mekanisme Kerja Antibakteri (Ahmed & Shajali, 2020)

Penghambatan proses sintesis dinding sel bakteri merupakan hal yang krusial dalam kehidupan suatu bakteri. Antibiotik yang menghambat proses sintesis dinding sel adalah golongan  $\beta$ -laktam.  $\beta$ -laktam mengikat reseptor membran sel bakteri yang dikenal sebagai pengikat peninsilin (PBP), hal tersebut karena memiliki kesamaan struktural dengan substrat PBP endogen, *D-alanyl-D-alanin*. Pada sisi aktifnya,  $\beta$ -laktam mengasetilasi residu serin yang menyebabkan enzim tidak dapat berikatan dengan substrat alaminya (Pancu et al., 2021).

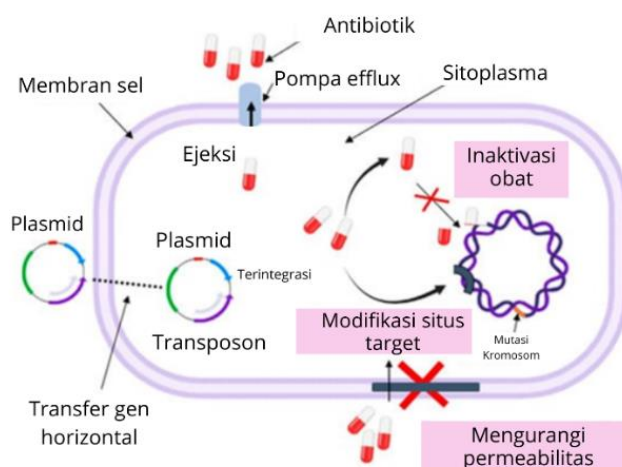
Proses sintesis protein pada sel bakteri terdiri atas beberapa tahap, yaitu inisiasi dan elongasi yang terdiri dari masuknya aminoasil tRNA, pengoreksian, transfer peptidil, translokasi karbon dan terminasi. Pada tahap ini antibiotik melalui pengikatan

subunit ribosom 30S atau 50S. Antibiotik yang berikatan dengan subunit ribosom 50S menghambat pembentukan peptida baru sementara yang berikatan dengan subunit 30S menghambat translasi dengan cara memicu perubahan konformasi pada situs A unit ribosom yang mengakibatkan kesalahan pembacaan kodon dan penerjemahan mRNA dan di sisi lain pembentukan kompleks menghambat pemunculan asil t-RNA ke dalam situs yang tidak lagi dikenal oleh kodon mRNA yang mengakibatkan kemampuan ribosom dalam mensintesis protein menjadi terganggu (Pancu et al., 2021)

Sintesis asam nukleat dalam sel bakteri dapat dihentikan melalui penghambatan aktivitas enzim yang bertanggungjawab dalam sintesis RNA dan DNA. Antibiotik yang memicu penghambatan sintesis RNA mengganggu proses transkripsi bakteri, sehingga menyebabkan terganggunya viabilitas sel. Golongan antibiotik yang memicu penghambatan tersebut diantaranya adalah *rifamycin* dan *fidaxomicin* atau *lipiarmycin* beberapa antibiotik tersebut menghambat RNA polimerase bakteri. Inhibitor DNA memberikan efeknya dengan menekan sintesis DNA di dalam sel bakteri dengan mengganggu aktivitas enzim topoisomerase tipe II (DNA girase) dan DNA topoisomerase tipe IV (Pancu et al., 2021)

### I.2.10 Resistensi Antibiotik

Bakteri patogen yang baru muncul dan resisten terhadap beberapa agen antibakteri dapat mengakibatkan berkurangnya kemanjuran dalam pengobatan infeksi. Mekanisme resistensi antibiotik mencakup sistem ekspor aktif di dalam membran sel bakteri, pencegahan masuknya obat antibiotik ke dalam sel bakteri yang bersifat patogen, penghancuran agen antibiotik secara enzimatik, produksi biofilm tebal, target antibiotik yang dimodifikasi dan lingkungan sekitar bakteri yang terlindungi dari obat antibiotik (Varela et al., 2021).



**Gambar 5.** Mekanisme Resistensi Antibiotik oleh Bakteri *Salmonella* spp. (Teklemariam et al., 2023).

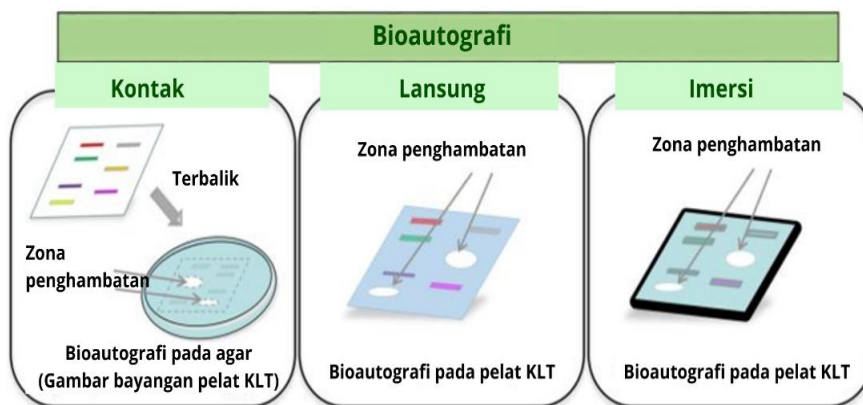
Bakteri *Salmonella* menggunakan berbagai mekanisme resistensi untuk melawan antimikroba melalui inaktivasi obat (Gambar 8). Pada jalur ini, unit fungsional



antibiotik di inaktivasi melalui modifikasi kimia dengan bantuan enzim yang menghidrolisis reaksi fosforilasi, asetilasi, dan adenilasi. Selain itu, enzim seperti *kloramfenikol asetiltransferase* dan *penisilinase*, masing-masing dapat mengasetilasi dua gugus hidroksil, yaitu kloramfenikol dan cincin  $\beta$ -laktam dari penisilin dan sefalosporin (Teklemariam et al., 2023).

### 1.2.11 Metode Uji KLT Bioautografi

Metode uji KLT Bioautografi merupakan cara pengujian yang mengintegrasikan pemisahan senyawa kimia secara KLT (Kromatografi Lapis Tipis) dengan uji secara biologi untuk mendeteksi aktivitas antibakteri, antijamur, antitumor dan antioksidan. Keunggulan dari metode ini, yaitu memiliki cara penerapan tergolong sederhana, biaya operasional murah, serta tingkat sensitifitas dan spesifitas pengujian yang tinggi. Prinsip kerja KLT (Kromatografi Lapis Tipis) adalah campuran dipisahkan dengan bahan absorpsi yang dilapisi pada permukaan pelat pendukung sebagai fase diam dan eluen sebagai fase gerak. Pemanfaatan kapasitas absorpsi yang berbeda dari setiap komponen dalam fase diam, absorpsi dan desorpsi terus menerus dapat dihasilkan selama proses elusi fase gerak untuk mencapai pemisahan komponen yang berbeda. Hasil pemisahan senyawa secara KLT (Kromatografi Lapis Tipis) diintegrasikan dengan teknik Bioautografi untuk mengidentifikasi kemampuan aktivitas biologis yang ditandai dengan adanya zona hambat yang terbentuk (Kuang et al. 2021).



**Gambar 6.** Skema metode uji KLT Bioautografi (Grzelak et al., 2016)

Metode uji KLT Bioautografi yang biasa diterapkan diantaranya, yaitu difusi agar (*contact bioautography*), Bioautografi lansung (*direct bioautography*), Bioautografi imersi (*agar overlay*). Adapun teknik terbaru, yaitu Bioautografi HPTLC dan Bioautografi 2D-TLC (Kuang et al. 2021).

## 1. Metode Klasik

### a. Bioautografi kontak (*contact bioautography*)

Cara kerjanya, yaitu media agar diinokulasikan dengan mikroorganisme patogen baik itu jamur ataupun bakteri kemudian di atasnya diletakkan pelat KLT



yang telah terabsorpsi dengan senyawa menghadap ke bawah dan bersentuhan dengan permukaan media. Senyawa diletakkan dengan posisi bersentuhan dengan permukaan media selama beberapa waktu untuk berdifusi. Setelah itu, pelat KLT diangkat lanjut diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

**b. Bioautografi langsung (*direct bioautography*)**

Metode ini dilakukan dengan cara, yaitu pelat KLT disemprotkan langsung dengan suspensi mikroorganisme patogen dengan larutan nutrisi khusus pada konsentrasi tertentu atau langsung meletakkan pelat KLT ke dalam suspensi. Hasil percobaan dapat diamati secara langsung atau di bawah reagen warna yang sesuai setelah diinkubasi pada suhu 30°C dan interval waktu 2-3 hari.

**c. Bioautografi *agar overlay***

Metode *agar overlay* biasa juga disebut dengan metode tanam atau perendaman. Metode ini merupakan gabungan dari metode bioautografi difusi agar dan langsung. Cara kerjanya, yaitu media agar yang masih cair ditambahkan dengan suspensi mikroorganisme lalu ditanam di dalamnya pelat KLT. Setelah itu, diinkubasi selama 37°C selama 24 jam.

## **2. Metode terbaru**

**a. HPTLC Bioautografi**

Metode HPTLC Bioautografi merupakan teknologi baru untuk memfilter zat aktif dan dapat memberikan sidik kromatografi yang dapat ditampilkan secara elektronik. Teknik ini merupakan, hasil modifikasi dari pelat KLT, karena menggunakan mikropartikel silikon (5-10 µm) dengan distribusi ukuran partikel yang sempit. Sensitivitas dan resolusi kromatografi lapis tipis ditingkatkan secara signifikan dengan menggunakan teknik multistage atau sirkular. Kunggulan metode ini dibandingkan dengan metode KLT Bioautografi diantaranya, yaitu resolusi yang lebih baik, waktu analisis yang lebih singkat, peningkatan sensitivitas deteksi, dan efisiensi pemakaian reagen, sampel dan media kultur.

**b. D-TLC Bioautografi**

Tiga metode klasik harus diulang dengan menggunakan sejumlah besar sistem pelarut yang berbeda untuk lebih memisahkan unsur kimia polar dan non-polar untuk memperoleh ekstrak kasar. Metode Bioautografi 2D-TLC memperbaiki kekurangan tersebut, karena pelat TLC dibuat sekaligus dengan pelarut polar, diputar 90° dan kemudian dibuat untuk kedua kalinya dengan sistem pelarut non-polar. Pelat 2D-TLC kemudian dikeringkan dan disemprot dengan NB (*Nutrient Broth*). Selain itu, Bioautografi 2D-TLC menghilangkan kebutuhan untuk pembuatan sejumlah besar pelat dalam berbagai sistem pelarut, mengurangi jumlah limbah pelarut yang akan dibuang, dan secara signifikan mengurangi waktu yang diperlukan untuk mengidentifikasi senyawa aktif. Teknologi ini dicirikan dengan kemudahan pengoperasiannya, tidak memerlukan peralatan khusus, dan sangat cocok untuk obat-obatan alami dengan komposisi kimia yang kompleks.

### **I.3 Tujuan Penelitian**

1. Mengidentifikasi senyawa bioaktif yang terkandung dalam ekstrak daun Paliasa *Kleinhovia hospita* L. yang berpotensi sebagai antibakteri.
2. Mengkaji bioaktivitas senyawa daun Paliasa *Kleinhovia hospita* L. sebagai antibakteri terhadap *Salmonella typhi* dengan uji KLT Bioautografi.

### **I.4 Manfaat Penelitian**

Penelitian ini diharapkan agar dapat dijadikan sebagai sumber informasi mengenai potensi daun Paliasa *Kleinhovia hospita* L. sebagai obat demam tifoid dan menjadi sumber referensi untuk penelitian terbaru yang terkait bioaktivitas daun Paliasa sebagai antibakteri terhadap bakteri *Salmonella typhi* dengan metode uji KLT Bioautografi.

### **I.5 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini berlangsung dari Bulan Februari sampai Juni 2024, dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, serta di Laboratorium Fitokimia dan Biofarmaka, Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin, Makassar.

## BAB II

### METODE PENELITIAN

#### II.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu *Biological Safety Cabinet* (BSC), inkubator, refrigerator, oven, *water bath*, autoklaf, mesin vakum, *powder herb grinder machine*, *rotary evaporator*, spektrofotometer UV-Vis, lampu UV 254 nm dan 365 nm, *hot plate*, *magnetic stirrer*, timbangan analitik, labu erlenmeyer 100 mL, labu erlenmeyer 250 mL, labu *buchner*, *funnel buchner*, cawan porselen 75 mL, gelas *beaker* 100 mL, gelas *beaker* 500 mL, gelas ukur 100 mL, gelas ukur 10 mL, tabung reaksi, cawan petri, *chamber*, *vial*, botol cokelat 20 mL, toples 2 L, pipet tetes, ose bulat, batang pengaduk, sendok tanduk, bunsen, penjepit tabung, pinset, gunting dan penggaris.

#### II.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu daun Paliasa *Kleinhovia hospita* L., kultur murni bakteri *Salmonella typhi*, media *Nutrient Agar* (NA), media *Mueller Hinton Agar* (MHA), aquades, metanol, n-hexane, etil-asetat, sitroborat (asam sitrat-asam borat), reagen dragendorf, lieberman burchard,  $\text{FeCl}_3$  5%, NaCl fisiologis 0,9%, HCl, ciprofloxacin, pelat KLT silika gel 60 F<sub>254</sub>, mikrokapiler, *white tip*, *cotton swab*, kertas saring, spoit 10 mL, aluminium foil dan plastik *wrap*.

#### II.3 Langkah Kerja

##### II.3.1 Pengambilan Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini, yaitu daun Paliasa *Kleinhovia hospita* L. yang diambil di daerah Kecamatan Kajang, Kabupaten Bulukumba. Sampel yang dipilih adalah daun 3-5 dari pucuk dan daun yang tidak ada bekas makan ulat. Waktu pengambilan sampel dilakukan pada hari Selasa, tanggal 6 Februari 2024 pada jam 07:30-09:00 WITA. Penelitian ini menggunakan daun Paliasa yang diambil di Kecamatan Kajang. Sampel diambil pada pagi hari untuk memperoleh senyawa aktif yang optimal. Jika sampel diambil siang hari, tanaman sedang berfotosintesis, sehingga senyawa yang ditarik kurang optimal (Yulian dan Safrijal, 2018 ; Sosilowati & Sari, 2020).

##### II.3.2 Pembuatan Simplisia

Daun Paliasa *Kleinhovia hospita* L. yang telah diambil sebagai sampel disortir dalam keadaan basah dengan memilih daun yang hijau, segar dan tanpa cacat seperti bercak, sobek atau berlubang. Sampel tersebut, kemudian dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran lalu ditiriskan agar airnya berkurang sehingga mempermudah proses pengeringan kemudian diangin-anginkan. Setelah itu, daun dipotong-potong dan dikeringkan di oven pada suhu 50°C selama 48 jam. Suhu ini dipilih untuk menjaga komponen senyawa fungsional agar tidak rusak (Thamkaew et al., 2021). Pengeringan bertujuan untuk mengurangi kadar air dalam sampel dan mencegah kontaminasi mikroorganisme, sehingga sampel tahan lama (Sosilowati & Sari, 2020).

Setelah dikeringkan, daun dihancurkan menggunakan mesin penggiling herbal hingga menjadi serbuk kasar. Serbuk kasar dipilih karena ukuran yang kecil meningkatkan luas permukaan kontak dan interaksi dengan pelarut, namun jika terlalu halus akan menyulitkan proses penyaringan karena dapat menyumbat kertas saring pada saat tahap filtrasi (Budiati et al., 2021)

### II.3.3 Pembuatan Ekstrak

Serbuk simplisia sebanyak 75 gram lalu dimasukkan ke dalam gelas beaker kemudian ditambahkan dengan pelarut metanol sebanyak 750 mL lalu diaduk hingga homogen. Setelah itu, dimasukkan ke dalam toples dan ditutup rapat lalu dibungkus dengan kertas cokelat dan disimpan pada tempat yang tidak terdapat cahaya. Proses ekstraksi dilakukan selama 72 jam sambil sesekali diaduk setiap 8 jam sekali. Setiap 24 jam dilakukan filtrasi dan penambahan pelarut. Setelah itu, ekstrak yang diperoleh dipisahkan menggunakan *rotary evaporator* dan diuapkan hingga kental menggunakan *waterbath*. Setelah diperoleh ekstrak kental, dilanjutkan dengan perhitungan nilai persen rendemen (Ridwanto et al., 2022).

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat Ekstrak Kental}}{\text{Berat Simplisia}} \times 100\%$$

### II.3.4 Sterilisasi Alat dan Media

#### a. Sterilisasi alat dengan panas membara

Sterilisasi dikhususkan untuk alat-alat yang terbuat dari besi. Proses sterilisasi dilakukan melalui pemanasan alat dengan menggunakan api bunsen sampai tampak membara.

#### b. Sterilisasi dengan panas kering

Sterilisasi dikhususkan untuk alat-alat gelas. Proses sterilisasi dilakukan melalui pemanasan alat secara panas kering (udara kering) dengan menggunakan oven pada suhu 180°C selama 2 jam.

#### c. Sterilisasi dengan panas basah

Sterilisasi dikhususkan untuk alat-alat yang tidak tahan panas dan media. Proses sterilisasi dilakukan melalui pemanasan alat dan media secara panas basah (uap air panas bertekanan) dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

### II.3.5 Pembuatan Media

#### a. Media *Nutrient Agar* (NA)

Bubuk *Nutrient Agar* (NA) ditimbang sebanyak 2,8 gram lalu dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer dan ditambahkan dengan 100 mL aquades kemudian diaduk hingga larut. Selanjutnya, media dipanaskan menggunakan *hot plate* dan dihomogenkan dengan bantuan *magnetic stirrer* yang dimasukkan pada erlenmeyer. Setelah itu,

media disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

**b. Media Mueller Hinton Agar (MHA)**

Bubuk *Mueller Hinton Agar* (MHA) ditimbang sebanyak 3,4 gram lalu dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan dengan 100 mL aquades kemudian diaduk hingga larut. Selanjutnya, media dipanaskan menggunakan *hot plate* dan dihomogenkan dengan bantuan *magnetic stirrer* yang dimasukkan pada erlenmeyer. Setelah itu, media di sterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

### II.3.6 Persiapan Bakteri Uji

**a. Peremajaan kultur murni**

Kultur murni dari bakteri *Salmonella typhi* yang diambil dari Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi Unhas diinokulasikan menggunakan ose bulat pada media agar miring dengan medium *Nutrient Agar* (NA) yang dilakukan secara aseptis. Setelah itu, dilanjutkan dengan proses inkubasi pada inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam.

**b. Pembuatan suspensi bakteri**

Kultur bakteri *Salmonella typhi* yang sebelumnya telah diremajakan selanjutnya disuspensikan menggunakan pelarut *NaCl* fisiologis 0,9% dan dihomogenkan menggunakan vortex. Kemudian, tingkat kekeruhan suspensi disesuaikan dengan standar *McFarland* 0,5 ( $1,5 \times 10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>) dengan mengukur nilai absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 580 nm dengan nilai transmitan 25% (setara dengan kepadatan 10<sup>8</sup>).

### II.3.7 Pemisahan Komponen Kimia secara KLT

**a. Persiapan fase gerak dan fase diam**

Fase gerak yang digunakan, yaitu eluen dengan campuran etil-asetat dan n-hexane dengan perbandingan 1:1 dimasukkan ke dalam *chamber* lalu dijenuhkan menggunakan kertas saring selama 10 menit. Tujuan penjenuhan agar tekanan uap pada seluruh bagian *chamber* sama. Setelah itu, dilakukan pembuatan fase diam. Fase diam terbuat dari pelat KLT silika gel 60 F<sub>254</sub>, pelat KLT dipotong dengan ukuran 1x6 cm. Kemudian diberi tanda garis pada tepi batas atas 0,2 cm dan batas bawah 0,8 cm menggunakan pensil. Selanjutnya pelat diaktifkan dengan cara dipanaskan pada oven dengan suhu 105°C selama 10 menit yang bertujuan untuk menghilangkan kadar air pada pelat KLT.

**b. Penotolan sampel ekstrak**

Ekstrak kental daun *Paliassa Kleinhovia hospita* L. diencerkan menggunakan pelarut metanol. Ekstrak yang telah diencerkan diambil menggunakan mikropipiler 5µL lalu ditotolkan pada pelat KLT sebanyak tiga kali dan ditunggu hingga mengering. Selanjutnya, pelat KLT dicelupkan memakai pinset ke dalam *chamber* yang berisi eluen dan didiamkan sampai eluen merambat (tidak melebihi batas atas). Kemudian hasil elusidasi diangin-anginkan hingga eluen menguap dan dilanjutkan dengan

pengamatan bercak dibawa sinar tampak, lampu UV 254 nm dan 366 nm lalu ditentukan nilai *Rf*-nya.

$$Rf = \frac{\text{Jarak yang ditempuh analit}}{\text{Jarak yang ditempuh eluen}}$$

### II.3.8 Identifikasi Senyawa secara Kualitatif

Sebanyak 5 pelat KLT hasil elusidasi masing-masing diberi tanda jenis senyawa yang akan diidentifikasi. Masing-masing pelat KLT di semprotkan dengan reagen penampak bercak yang sesuai dengan jenis senyawa yang akan diidentifikasi. Untuk identifikasi golongan senyawa flavonoid, alkaloid, tanin, steroid dan terpenoid secara berturut-turut disemprotkan dengan penampak bercak sitroborat (asam sitrat-asam borat), reagen dragendorf,  $\text{FeCl}_3$  5%, lieberman-burchard dan  $\text{FeCl}_3$  5%. Sementara untuk golongan senyawa saponin diidentifikasi melalui *frothing test* dengan cara memasukkan ekstrak yang telah diencerkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan dengan aquades dan HCl lalu dikocok dengan keras kemudian diamati konsistensi busa yang terbentuk selama 30 menit.

### II.3.9 Pengujian Antibakteri secara KLT Bioautografi

Metode pengujian yang digunakan adalah metode kontak. Media *Mueller Hinton Agar* (MHA) dituang ke dalam cawan petri dibiarkan hingga mengeras. Setelah itu, suspensi bakteri *Salmonella typhi* dioles sampai merata di atas permukaan media menggunakan *cotton swab* (Hasanah & Gultom, 2020). Untuk kontrol positif, pelat KLT yang telah terelusi diletakkan di atas media secara perlahan sampai tertempel sempurna lalu ditekan secara pelan. Sementara, untuk kontrol negatif diletakkan pelat kosong di atas media secara perlahan sampai tertempel sempurna. Kemudian, disimpan selama 60 menit di dalam refrigator pada suhu 4°C lalu dicabut dari media. Selanjutnya, dilakukan proses inkubasi pada inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam. Kemudian, diamati zona bening yang terbentuk.

### II.3.10 Analisis Data

Kemampuan daun Paliasa *Kleinhovia hospita* L. dalam pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi* dengan metode KLT Bioautografi diidentifikasi dengan cara mengamati zona bening yang terbentuk di sekitar bercak pada pelat KLT.