

# **SKRIPSI**

## **UJI AKTIVITAS ANTIMIKROBA BUAH DENGAN (*Dillenia serrata* Thunb.) DAN PROFIL SENYAWA AKTIF DENGAN KLT-BIOAUTOGRAFI**

Disusun dan diajukan oleh

**ASRIYANI SUAIB  
N111 16 344**

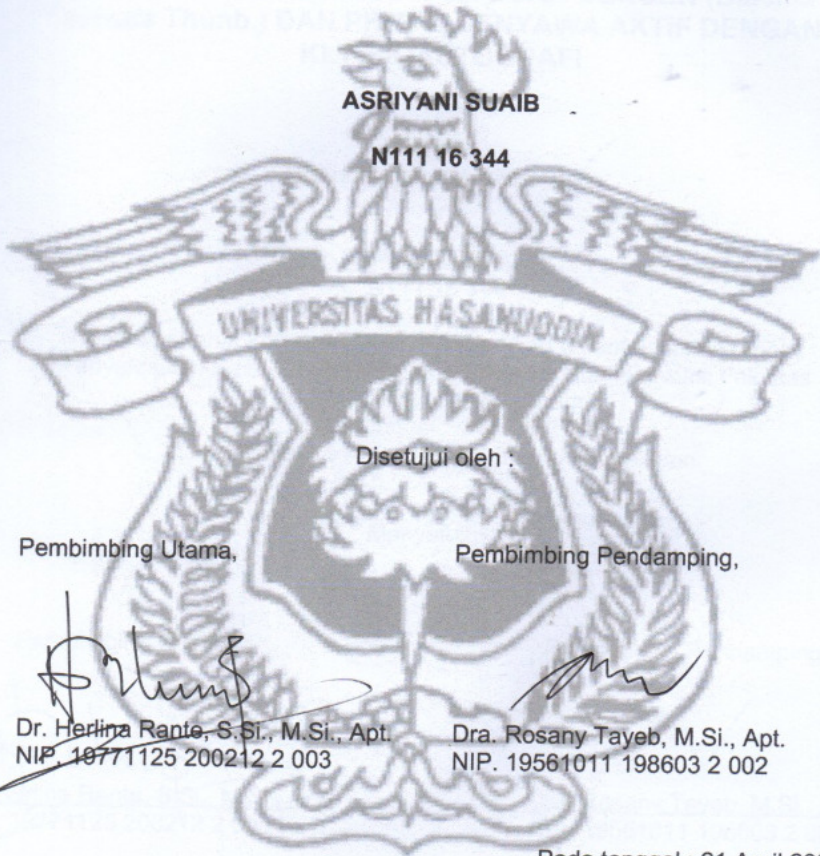


**PROGRAM STUDI FARMASI  
FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2021**

**UJI AKTIVITAS ANTIMIKROBA BUAH DENGAN (*Dillenia serrata* Thunb.)  
DAN PROFIL SENYAWA AKTIF DENGAN KLT-BIOAUTOGRAFI**

**ASRIYANI SUAIB**

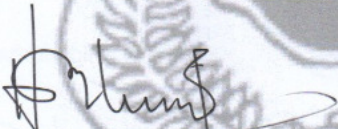
**N111 16 344**




Disetujui oleh :

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping,

  
Dr. Herlina Rante, S.Si., M.Si., Apt.  
NIP. 10771125 200212 2 003

  
Dra. Rosany Tayeb, M.Si., Apt.  
NIP. 19561011 198603 2 002

Pada tanggal : 21 April 2021

## LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

### UJI AKTIVITAS ANTIMIKROBA BUAH DENGAN (*Dillenia serrata* Thunb.) DAN PROFIL SENYAWA AKTIF DENGAN KLT-BIOAUTOGRAFI

Disusun dan diajukan oleh

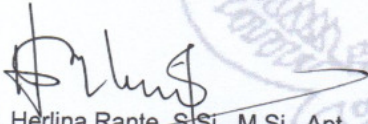
**ASRIYANI SUAIB**  
N111 16 344

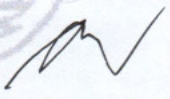
Telah dipertahankan di hadapan Panitia yang dibentuk dalam rangka Penyelesaian Studi Program Sarjana Program Studi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin pada tanggal April 2021 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui :


Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping,

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

  
Dra. Rosany Tayeb, M.Si., Apt.  
NIP. 19561011 198603 2 002

Ketua Program Studi,

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





## PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Asriyani Suaib  
NIM : N111 16 344  
Program Studi : Farmasi  
Jenjang : S1

Menyatakan dengan ini bahwa Skripsi dengan judul "Uji Aktivitas Antimikroba Buah Dengan (*Dillenia serrata* Thunb.) Dan Profil Senyawa Aktif Dengan KLT-Bioautografi" adalah karya saya sendiri dan tidak melanggar hak cipta pihak lain. Apabila di kemudian hari Skripsi karya saya ini terbukti bahwa sebagian atau keseluruhannya adalah hasil karya orang lain yang saya pergunakan dengan cara melanggar hak cipta pihak lain, maka saya bersedia menerima sanksi.

Makassar, 21 April 2021  
Yang Menyatakan

  
METERAI  
TEMPEL  
9A524AHF911661128  
6000  
ENAM RIBU RUPIAH  
ASRIYANI SUAIB

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan syukur yang tak terhingga penulis haturkan dengan segala puji bagi Allah swt yang telah memberikan rahmat dan hidayah-Nya dalam segala hal yang telah diberikan sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini sebagai persyaratan untuk menyelesaikan studi dan memperoleh gelar sarjana di Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin.

Penyusunan skripsi ini, penulis menyadari bahwa banyak hambatan-hambatan yang harus dilewati yang tidak terlepas dari dukungan beberapa pihak yang sangat berpengaruh. Penulis dapat melewati karena mendapat dukungan moril maupun materil yang sangat berpengaruh signifikan pada penyelesaian skripsi ini. Dalam kesempatan ini, penulis ingin menyampaikan rasa terima kasih yang luar biasa untuk Ibu Dr. Herlina Rante, S.Si., M.Si., Apt selaku pembimbing utama yang memberikan pengaruh luar biasa dalam skripsi ini dan Ibu Dra. Rosany Tayeb, M.Si., Apt selaku pembimbing pendamping, terima kasih penulis haturkan karena telah ikhlas dalam meluangkan waktu dan pikirannya dalam memberikan pengarahan, bimbingan, saran, nasehat serta dukungan selama proses penelitian dan penyusunan skripsi ini. Ucapan terima kasih yang luar biasa juga penulis haturkan kepada:

1. Bapak Dekan beserta Wakil Dekan Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin.

2. Ibu Dr. Sartini, M.Si., Apt dan Bapak Abdul Rahim, S.Si., M.Si., Ph.D., Apt selaku penguji yang telah memberikan saran dan nasehat dalam penyelesaian skripsi ini.
3. Ibu Dra, Aisyah Fatmawaty, M.Si., Apt selaku penasehat akademik yang telah banyak memberikan saran selama masa perkuliahan.
4. Bapak Muhammad Raihan, S.Si., M.Sc.Stud., Apt selaku penasehat akademik yang telah banyak memberikan saran selama sama penelitian.
5. Staf Dosen dan Pegawai Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin atas bantuan yang telah diberikan selama masa perkuliahan dan hingga penyusunan skripsi.
6. Laboran laboratorium mikrobiologi Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin kepada Ibu Sumiati, S.Si.
7. Teman awal perkuliahan hingga sekarang yaitu terima kasih kepada Anugrah, S.Si., Andi Rifka Hanifah, S.Si., Siti Hardianti M. Suong, Andi Yurike Tenri Penyauri, S.Si. atas segala semangat dan masukan yang telah diberikan hingga kini.
8. Teman Angkatan 2016 (Neost16mine), Keluarga Mahasiswa Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin (KEMAFAR-UH) atas segala dukungan, doa, semangat, waktu, dan tempat berbagi cerita.
9. Teman perjuangan saya selama penelitian ini, terima kasih Dheanawati Putri dan Sartika atas segala bantuan dan kerjasamanya selama ini.

10. Teman terdekat peneliti, terima kasih kepada Annisa Iqriyah Bangsawan, S.Si., Nur Khamila yang telah bersedia memberikan semangat, dukungan, dan tempat berbagi keluh kesah selama proses ini.
11. Pihak yang tidak sempat disebutkan namanya satu persatu. Penulis mengucapkan terima kasih secara tulus.

Yang terkasih dan terima kasih kepada Ayahanda H. Suaib dan Ibunda Hj. Suryawati yang telah memberikan segalanya terhadap penulis baik moril maupun materil dari awal perkuliahan hingga penyelesaian skripsi ini dan tak hentinya mengirimkan doa pada penulis hingga sekarang, semoga tetap berada dalam lindungan Allah swt. Yang tak terlupa, terima kasih kepada kakak kandung penulis yaitu Ardiansyah Suaib, S.E. dan adik kandung penulis Annisa Suaib yang sedang berusaha mengejar mimpi menjadi seorang dokter atas segala bentuk dukungan dan semangat yang selalu diberikan tanpa henti.

Penulis menyadari akan segala keterbatasan yang dimiliki selama penyusunan skripsi ini. Dengan hal di atas, penulis mengharapkan skripsi ini berguna untuk pengembangan dalam ilmu pengetahuan. Aamiin.

Makassar, 21 April 2021

Asriyani Suaib

## ABSTRAK

**ASRIYANI SUAIB.** *Uji Aktivitas Antimikroba Buah Dengen (*Dillenia serrata* Thunb.) dan Profil Senyawa Aktif dengan Klt-bioautografi* (dibimbing oleh Herlina Rante dan Rosany Tayeb)

Penyakit infeksi merupakan masalah penting dalam bidang kesehatan di hampir semua negara berkembang. Penyakit infeksi biasanya disebabkan oleh beberapa mikroorganisme seperti, bakteri, parasit, virus, atau jamur. Terapi atau pengobatan terhadap infeksi mikroorganisme patogen dilakukan dengan pemberian antimikroba. Adapun bahan alam yang dapat digunakan sebagai antimikroba adalah tumbuhan dengan (*Dillenia serrata* Thunb.). Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui efek antimikroba dari buah dengan dalam menghambat mikroba uji serta mengetahui profil KLT-Bioautografi dari ekstrak dan liofilisat buah dengan. Tahap penelitian meliputi pembuatan ekstrak menggunakan metode maserasi dan liofilisasi, pengujian aktivitas antimikroba menggunakan metode difusi dengan *paper disc*, pengujian KLT-Bioautografi, dan skrining fitokimia. Hasil penelitian menunjukkan liofilisat buah dengan memiliki aktivitas antimikroba yang lebih baik dibandingkan dengan ekstrak n-heksan dan metanol buah dengan. Hasil pemisahan menggunakan KLT diperoleh enam noda dengan nilai RF berturut-turut yaitu 0,51; 0,53; 0,64; 0,69; 0,78; dan 0,89. Hasil uji KLT-Bioautografi menunjukkan adanya zona bening pada nilai RF 0,51; 0,53; dan noda pada tempat penotolan. Kandungan senyawa berdasarkan skrining fitokimia pada liofilisat buah dengan diduga mengandung golongan senyawa tanin.

Kata Kunci : Penyakit Infeksi, Buah Dengen (*Dillenia serrata* Thunb.), Maserasi, Liofilisasi, Antimikroba, KLT-Bioautografi, SkriningFitokimia.



## ABSTRACT

**ASRIYANI SUAIB.** *Antimicrobial Activity Test of Dengen Fruit (*Dillenia Serrata* Thunb.) and Active Compound Profile with Tlc-Bioautography* (Supervised by Herlina Rante and Rosany Tayeb)

Infectious diseases are an important problem in the health sector in almost all developing countries. Infectious diseases are usually caused by several microorganisms such as bacteria, parasites, viruses, or fungi. Therapy or treatment for infection with pathogenic microorganisms can be cured by administering antimicrobials. The natural ingredients that can be used as antimicrobials are dengen (*Dillenia serrata* Thunb.). The purpose of this study was to determine the antimicrobial effect of dengen fruit in inhibiting the test microbes and to determine the TLC-Bioautographic profile of the extract and lyophilisate of dengen fruit. The research stage included making extracts using maceration and lyophilization methods, testing for antimicrobial activity using diffusion methods with paper discs, TLC-Bioautography testing, and phytochemical screening. The results showed that the lyophilisate of dengen fruit had better antimicrobial activity than the n-hexane and methanol extracts of dengen fruit. The result of separation using TLC obtained six spots with each RF value of 0.51; 0.53; 0.64; 0.69; 0.78; and 0.89. The TLC-Bioautography test results showed a clear zone at the RF values of 0.51; 0.53; and stain in the spot. The compound content based on phytochemical screening on the lyophilisate of dengen fruit is thought to contain a class of tannin compounds.

Key words: Infectious diseases, Dengen Fruit (*Dillenia serrata* Thunb.), Maceration, Lyophilization, Antimicrobial, TLC-Bioautography, Phytochemical Screening.

## DAFTAR ISI

UCAPAN TERIMA KASIH.....	v
ABSTRAK.....	viii
ABSTRACT.....	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL.....	xv
DAFTAR GAMBAR.....	xvi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
I.1 Latar Belakang.....	1
I.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	4
II.1 Uraian Tanaman.....	4
II.1.1 Klasifikasi Tumbuhan Dengan ( <i>Dillenia serrata</i> Thunb.).....	4
II.1.2 Morfologi Tumbuhan .....	5
II.1.3 Kandungan Kimia.....	6

II.1.4 Kegunaan Tumbuhan Dengan .....	7
II.2 Uraian Mikroba Uji.....	7
II.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	7
II.2.1.1 Klasifikasi.....	7
II.2.1.2 Sifat dan Morfologi .....	8
II.2.1 <i>Escherichia coli</i> .....	8
II.2.1.1 Klasifikasi.....	8
II.2.1.2 Sifat dan Morfologi .....	9
II.2.1 <i>Candida albicans</i> .....	9
II.2.1.1 Klasifikasi.....	9
II.2.1.2 Sifat dan Morfologi .....	9
II.3 Metode Ekstraksi Bahan Alam.....	10
II.3.1 Definisi Ekstraksi.....	10
II.3.2 Tujuan Ekstraksi.....	10
II.3.3 Metode Ekstraksi.....	11
II.4 <i>Freeze Drying</i> .....	14
II.4.1 Definisi <i>Freeze Drying</i> .....	14

II.4.2 Prinsip <i>Freeze Drying</i> .....	15
II.5 Uraian Umum Antimikroba.....	16
II.5.1 Definisi Antimikroba.....	16
II.5.2 Mekanisme Kerja Antimikroba.....	17
II.6 Metode Pemisahan secara Kromatografi Lapis Tipis.....	20
II.7 KLT-Bioautografi.....	24
<b>BAB III METODE PENELITIAN.....</b>	<b>26</b>
III.1 Waktu dan Lokasi Penelitian .....	26
III.2 Alat dan Bahan .....	26
III.3 Mikroba Uji.....	27
III.4. Metode Uji.....	27
III.4.1 Pengambilan Sampel.....	27
III.4.2 Pengolahan Sampel .....	27
III.4.3 Penyiapan Liofilisat Buah Dengan.....	27
III.4.4 Penyiapan Ekstrak Buah Dengan.....	28
III.4.5 Pembuatan Variasi Konsentrasi Ekstrak dan Liofilisat Buah Dengan.....	28

III.4.6 Sterilisasi Alat.....	29
III.4.7 Penyiapan Media.....	29
III.4.7.1 Pembuatan Media Agar Miring.....	29
III.4.7.2 Media <i>Nutrient Agar</i> (NA).....	30
III.4.7.3 Media <i>Potato Dextrose Agar</i> (PDA).....	30
III.4.8 Penentuan Aktivitas Daerah Hambat.....	30
III.4.8.1 Pembuatan Larutan Standar <i>Mc. Farland</i> 0,5.....	30
III.4.8.2 Peremajaan Mikroba Uji.....	30
III.4.8.3 Pembuatan Suspensi Mikroba.....	31
III.4.8.4 Penentuan Diameter Daerah Hambat.....	31
III.4.9 Pemisahan Senyawa dengan Kromatografi Lapis Tipis.....	32
III.4.10 Pengujian KLT-Bioautografi.....	32
III.4.11 Skrining Fitokimia.....	33
III.4.11.1 Uji Alkaloid.....	33
III.4.11.2 Uji Tanin.....	33
III.4.11.3 Uji Flavonoid.....	33
III.4.11.4 Uji Senyawa Organik.....	34

III.4.12 Pengolahan dan Analisis Data.....	35
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	36
IV.1 Penyiapan Ekstrak Buah Dengan ( <i>Dillenia serrata</i> Thunb.) .....	36
IV.2 Hasil Pengujian Aktivitas Antimikroba Dari Ekstrak dan Liofilisat Buah Dengan terhadap <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , dan <i>Candida albicans</i> .....	37
IV.3 Hasil Pemisahan KLT.....	41
IV.4 Hasil Pengujian KLT-Bioautografi dan Skrining Fitokimia .....	42
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	48
V.1 Kesimpulan.....	48
V.2 Saran.....	48
DAFTAR PUSTAKA.....	49
LAMPIRAN.....	54



## DAFTAR TABEL

Tabel	halaman
1. Hasil Penimbangan Ekstrak Heksan, Ekstrak Metanol dan Liofilisat Buah Dengan	37
2. Hasil Pengujian Aktivitas Antimikroba Ekstrak Heksan Buah Dengan terhadap Bakteri <i>Escherichia coli</i> , Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> , dan Fungi <i>Candida albicans</i>	38
3. Hasil Skrining Fitokimia pada Liofilisat Buah Dengan	44

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
1. Tumbuhan Dengen ( <i>Dillenia serrata</i> Thunb.)	4
2. Kromatogram Liofilisat Buah Dengen Menggunakan Fase Gerak Kloroform : Metanol (3:1 v/v)	42
3. Hasil Uji Aktivitas Antimikroba Liofilisat Buah Dengen Menggunakan Metode KLT-Bioautografi	43
4. Hasil Skrining Fitokimia Menggunakan Fase Gerak Kloroform : Metanol (3:1 v/v)	45
5. Hasil Ekstraksi dan Liofilisasi Buah Dengen	60
6. Hasil Uji Aktivitas Antimikroba Ekstrak Heksan Buah Dengen terhadap Mikroba Uji	61
7. Hasil Uji Aktivitas Antimikroba Ekstrak Metanol Buah Dengen terhadap Mikroba Uji	62
8. Hasil Uji Aktivitas Antimikroba Liofilisat Buah Dengen terhadap Mikroba Uji	63

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	halaman
1. Skema Kerja Penelitian (Pembuatan Ekstrak hingga Penarikan Kesimpulan)	54
2. Komposisi Media	55
3. Skema Kerja Pembuatan Ekstrak Buah Dengan ( <i>Dillenia Serrata</i> Thunb.)	56
4. Skema Kerja Penentuan Aktivitas Antimikroba Menggunakan Metode Difusi	57
5. Skema Kerja KLT-Bioautografi dan Skrining Fitokimia	58
6. Surat Determinasi Tumbuhan	59
7. Dokumentasi Penelitian	60
8. Perhitungan %Rendemen Ekstrak Buah Dengan	64
9. Perhitungan Konsentrasi Sampel	65

# BAB I

## PENDAHULUAN

### I.1 Latar Belakang

Penyakit infeksi merupakan masalah penting dalam bidang kesehatan di hampir semua negara berkembang (Widoyono, 2008). Berdasarkan Kemenkes tahun 2009, penyakit diare, penyakit tifoid, demam berdarah, infeksi saluran pernapasan atas (influenza, radang amandel, radang tenggorokan), radang paru-paru dan demam yang belum diketahui penyebabnya (observasi febris) merupakan penyakit infeksi yang termasuk ke dalam 10 penyakit terbanyak yang terjadi pada rumah sakit di Indonesia (Kemenkes, 2009). Penyakit infeksi biasanya disebabkan oleh beberapa mikroorganisme seperti bakteri, parasit, virus atau jamur (Hawley, 2003).

Terapi atau pengobatan terhadap infeksi mikroorganisme patogen dilakukan dengan pemberian antimikroba. Penggunaan antimikroba (antibiotik, antifungi) yang tidak rasional telah menyebabkan banyaknya mikroba patogen beradaptasi dengan lingkungannya dan menjadi resisten terhadap obat tersebut. Meningkatnya masalah resisten dapat menyebabkan peningkatan kebutuhan terhadap obat antimikroba baru. Oleh karena itu, pencarian antimikroba baru termasuk dari bahan alam terus dilakukan (Martini dan Ellof, 1998; Yustina, 2001).

Adapun bahan alam yang dapat digunakan sebagai antimikroba adalah tumbuhan dengan (*Dillenia serrata* Thunb.). Tumbuhan dengan merupakan

tumbuhan endemik Indonesia khususnya di Sulawesi Selatan. Tumbuhan Dengan memiliki beberapa nama daerah, diantaranya Dongi (Manado), Dengan (Sulawesi), Menampa (Tembuku). Tumbuhan dengan menghasilkan buah yang dapat dimakan dan memiliki rasa asam manis (Lim, 2012). *Dillenia serrata* termasuk ke dalam genus *Dillenia* yang memiliki enam puluh spesies, diantaranya *Dillenia indica*, *Dillenia pentagyna*, *Dillenia alata*, *Dillenia papuana*, *Dillenia serrata* dan lain-lain (Gandhi and Mehta, 2013). Spesies dari genus *Dillenia* digunakan dalam pengobatan tradisional terutama untuk gangguan pencernaan (Grosvenor *et al.*, 1995). Buah dari tumbuhan dengan dapat langsung dimakan atau digunakan untuk mengasamkan makanan. Rebusan kulit batang dari buah dengan digunakan secara oral untuk mengobati muntah darah (Windadri *et al.*, 2006).

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Wiart *et al* (2004) bahwa ekstrak metanol *Dillenia suffruticosa* menunjukkan aktivitas antimikroba dengan menghambat *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, dan *Pseudomonas aeruginosa*. Menurut Gasri (2018) bahwa ekstrak metanol kelopak buah dengan (*Dillenia serrata* Thunb.) dapat menghambat pertumbuhan *E. coli* dan ekstrak n-heksan kelopak buah dengan dapat menghambat pertumbuhan *S. aureus*. Menurut Nick *et al* (1995) bahwa ekstrak petroleum eter *Dillenia papuana* menunjukkan aktivitas antibakteri dengan menghambat bakteri *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, dan *Micrococcus luteus*.

Oleh karena itu penelitian ini dilakukan untuk mengetahui apakah buah dengen (*Dillenia serrata* Thunb.) memiliki aktivitas sebagai antimikroba serta mengetahui profil KLT-bioautografi dari ekstrak dan liofilisat buah dengen.

## **I.2 Rumusan Masalah**

Apakah buah dengen (*Dillenia serrata* Thunb.) memiliki aktivitas antimikroba dan bagaimanakah profil KLT-bioautografi dari ekstrak dan liofilisat buah dengen.

## **I.3 Tujuan Penelitian**

Untuk mengetahui efek antimikroba dari buah dengen (*Dillenia serrata* Thunb.) dalam menghambat mikroba uji serta mengetahui profil KLT-bioautografi dari ekstrak dan liofilisat buah dengen.



## BAB II

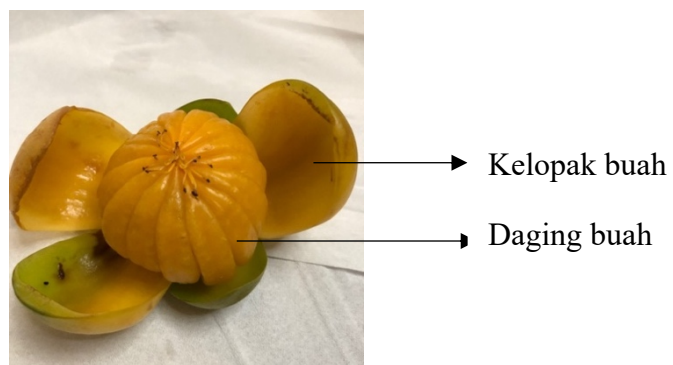
### TINJAUAN PUSTAKA

#### II.1 Uraian Tumbuhan

##### II.1.1 Klasifikasi Tumbuhan Dengan (*Dillenia serrata* Thunb.)

Tumbuhan dengan (*Dillenia serrata* Thunb.) memiliki susunan taksonomi sebagai berikut (Illing *et al.*, 2017):

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Viridiplantae
Superdivision	: Embriophyta
Division	: Spermatophyta/Tracheophyta
Class	: Dicotyledonae/Magnoliopsida
SuperOrdo	: Dilleniaanae
Ordo	: Dilleniales
Family	: Dilleniaceae
Genus	: <i>Dillenia</i>
Spesies	: <i>Dillenia serrata</i> Thunb.



**Gambar 1.** Buah Dengen (*Dillenia serrata* Thunb.)

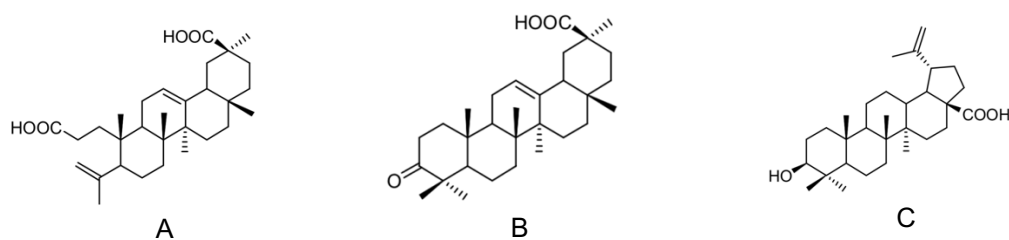
### II.1.2 Morfologi Tumbuhan

Dengen termasuk tumbuhan endemik yang berasal dari Sulawesi Selatan. Ciri khas dari buah tersebut berbentuk mahkota berwarna kuning, setengah mirip telinga bila di belah dengan helaian buahnya. Masyarakat setempat dulunya menggunakan buah ini untuk memberikan cita rasa asam untuk masakan mereka. Setelah di teliti buah dengan mengandung lebih dari 84% sari vitamin C, masyarakat kemudian mengolahnya menjadi jus sebelum dikonsumsi. Rasa yang dihasilkan memang cukup asam, tetapi dengan adanya penambahan gula maka dapat diperoleh rasa yang menyegarkan (Ilma, 2012).

Tumbuhan dengan memiliki tinggi mencapai 30 meter dengan garis tengah batang mencapai 70 cm. Tumbuhan dengan memiliki daun tunggal, lonjong sampai lanset dengan panjang 20-45 cm dan lebar 8-19 cm dan memiliki tangkai daun bersayap. Perbungaan pada tumbuhan dengan yaitu tandan dengan 2-6 bunga, tanpa daun mahkota dan berdaun kelopak 5 dengan garis tengah bunga sekitar 7,5 cm. Buah dengan memiliki bentuk menyerupai buah jeruk, tidak pecah, bulat agak gepeng dengan garis tengah sekitar 6 cm. Daun-daun buah (karpela) tertutup oleh daun-daun kelopak. Buah dengan yang masak berukuran 25 mm x 16 mm memiliki biji sampai lima. Biji dari buah dengan yaitu berwarna hitam, tanpa arilus. Jenis pohon ini berkerabat dekat dengan Rerer (*Dillenia celebica*) (Illing *et al.*, 2017).

### II.1.3 Kandungan Kimia

Jalil et al (2015) berhasil mengisolasi tiga senyawa aktif triterpenoid tipe aloanane dari akar dan kulit batang dari *Dillenia serrata* Thunb. yaitu asam kotjapik, asam 3-oxoolean-12-en-30-oic dan asam betulinat yang dapat dilihat pada gambar 2. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Jalil et al (2015) menyebutkan bahwa informasi mengenai data fitokimia dan farmakologi dari *Dillenia serrata* masih kurang dan masih perlu dilakukan identifikasi lebih lanjut. Adapun kandungan senyawa yang berhasil diisolasi dari genus *Dillenia* diantaranya, Pavanasasiva et al (1975) berhasil mengisolasi  $\beta$ -sitosterol, dillenetin dan asam galat dari daun, buah dan kulit kayu *Dillenia indica*. *Dillenia bracteata* diketahui memiliki beberapa kandungan senyawa aktif diantaranya, kaempherol-3,7-disulphate (Gurni et al., 1981), quarcetin (Gurni and Kubitzki, 1981),  $\beta$ -sitosterol, lupeol, betulin, dan asam betulinat (Dan and Dan, 1980).



**Gambar 1. Struktur kimia hasil isolasi dari *Dillenia serrata* Thunb.**

Keterangan:

A = asam kotjapik

B = asam 3-oxoolean-12-en-30-oic

C = asam betulinat

#### **II.1.4 Kegunaan Tumbuhan Dengen**

Buah dari tumbuhan dengen dapat langsung dimakan atau digunakan untuk mengasamkan makanan. Rebusan kulit batang dari buah dengen digunakan secara oral untuk mengobati muntah darah (Windadri, et al., 2006).

Adapun kegunaan dari spesies lain dari *Dillenia* diantaranya, *Dillenia indica*, *Dillenia papuana*, *Dillenia pentagyna*, *Dillenia philippinensis*, *Dillenia parviflora*, dan *Dillenia retusa* yaitu sebagai antimikroba (Nick, et al., 1995), antiinflamasi (Yeshwante, et al., 2009), antinosiseptif dan antioksidan (Abdille, et al., 2005), antidiabetes dan hypolipidemia (Kumar, et al., 2011), antileukemia (Kumar, et al., 2010), antitumor (Rosangkima, et al., 2008), antihipertensi (Nyman, et al., 1998), dan antiprotozoal (Nguye-Pouplin, et al., 2007).

### **II.2 Uraian Mikroba Uji**

#### **II.2.1 *Staphylococcus aureus***

##### **II.2.1.1 Klasifikasi**

Bakteri *Escherichia coli* memiliki susunan klasifikasi sebagai berikut (Garrity, et al., 2004):

Kingdom : Bacteria  
Filum : Firmicutes  
Class : Bacilli  
Ordo : Bacillales  
Family : Staphylococcaceae  
Genus : Staphylococcus

Species : *Staphylococcus aureus*

### **II.2.1.2 Sifat dan Morfologi**

*Staphylococcus aureus* adalah bakteri Gram positif. Sel-sel berbentuk bola berdiameter 0,5–1,5  $\mu\text{m}$ , terdapat dalam bentuk tunggal dan berpasangan dan secara khas membelah diri pada lebih dari satu bidang sehingga membentuk gerombolan yang tak teratur. non-motil, tidak diketahui adanya stadium istirahat. Dinding sel mengandung dua komponen utama yaitu peptidoglikan dan asam teikoat yang berkaitan dengannya. Kemoorganotrof metabolisme dengan respirasi dan fermentatif. Anaerob fakultatif tumbuh lebih cepat dan lebih banyak dalam keadaan aerobik suhu optimum 35–40°C. Terutama berasosiasi dengan kulit, selaput lendir hewan berdarah panas. Kisaran inangnyanya luas banyak galur merupakan patogen potensial (Garrity, et al., 2004).

## **II.2.2 *Escherichia coli***

### **II.2.2.1 Klasifikasi**

Bakteri *Escherichia coli* memiliki susunan klasifikasi sebagai berikut (Garrity, et al., 2004):

Kingdom : Bacteria  
Filum : Proterobacteria  
Class : Gamma Proteobacteria  
Ordo : Enterobacteriales  
Family : Enterobacteriaceae  
Genus : *Escherichia*

Species : *Escherichia coli*

### **II.2.2.2 Sifat dan Morfologi**

*Escherichia coli* merupakan bakteri Gram negatif berbentuk batang lurus 1,1–1,5 µm x 2,0–6,0 µm motil dengan flagellum peritrikum atau non motil. Tumbuh dengan mudah pada medium nutrisi sederhana. Laktosa difermentasi oleh sebagian besar galur dengan produksi asam dan gas (Pelczar, 2008).

### **II.2.3 *Candida albicans***

#### **II.2.3.1 Klasifikasi**

Jamur *Candida albicans* memiliki susunan klasifikasi sebagai berikut (Frobisher, 1983):

Division : Tallophyta

Subdivision : Fungi

Class : Deuteromycetes

Ordo : Moniliales

Family : Cryptococcaceae

Genus : *Candida*

Species : *Candida albicans*

#### **II.2.3.2 Sifat dan Morfologi**

Sel jamur *Candida albicans* berbentuk bulat, lonjong atau bulat lonjong. Koloninya pada medium padat sedikit menjulang dari permukaan medium, dengan permukaan halus, licin atau berlipat-lipat, berwarna putih kekuningan dan berbau ragi. Besar koloni bergantung pada umur. Pada tepi koloni dapat



dilihat hifa semu sebagai benang-benang halus yang masuk ke dalam medium. Pada medium cair jamur biasanya tumbuh pada dasar tabung.

Bentuk selnya bermacam-macam. Menghasilkan banyak pseudomiselium. Dapat terbentuk miselium sejati dan klamidospora. Blastospora dapat dijumpai pada posisi yang khas menurut masing-masing spesies. Perkembangbiakan vegetatif ialah melalui penguncupan multilateral. Dismilasi mungkin oksidatif, tetapi pada banyak spesies juga sangat fermentatif. Didalam medium cair dapat terbentuk endapan, sering kali berbentuk cincin, dan partikel (Pelczar, 2008).

### **II.3 Metode Ekstraksi Bahan Alam**

#### **II.3.1 Definisi Ekstraksi**

Ekstraksi adalah penyarian zat-zat berkhasiat atau zat-zat aktif dari bagian tanaman obat, hewan dan beberapa jenis akan termasuk biota laut. Zat-zat aktif tersebut terdapat di dalam sel, namun sel tanaman dan hewan berbeda demikian pula ketebalannya, sehingga diperlukan metode ekstraksi dan pelarut tersebut dalam mengekstraksi (Dirjen POM, 1986).

#### **II.3.2 Tujuan Ekstraksi**

Tujuan ekstraksi bahan alam adalah untuk menarik komponen kimia yang terdapat pada bahan alam. Ekstraksi ini didasarkan pada prinsip perpindahan massa komponen zat ke dalam pelarut, dimana perpindahan mulai terjadi pada lapisan antar muka kemudian berdifusi masuk kedalam pelarut (Harbone, 1987).

### II.3.3 Metode Ekstraksi

Untuk memperoleh ekstrak dari tanaman, metode ekstraksi terbagi menjadi dua yaitu ekstraksi dingin dan ekstraksi panas.

#### 1. Cara Dingin

##### a. Maserasi

Maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruang (kamar). Maserasi bertujuan untuk menarik zat-zat berkhasiat yang tahan pemanasan maupun yang tidak tahan pemanasan. Secara teknologi maserasi termasuk ekstraksi dengan prinsip metode pencapaian konsentrasi pada keseimbangan. Maserasi dilakukan dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan atau kamar (Depkes RI, 2000).

Maserasi berasal dari Bahasa latin *Macerace* berarti mengairi dan melunakkan. Maserasi merupakan cara ekstraksi yang paling sederhana. Dasar dari maserasi adalah melarutnya bahan kandungan simplisia dari sel yang rusak, yang terbentuk pada saat penghalusan, ekstraksi (difusi) bahan kandungan dari sel yang masih utuh. Setelah selesai waktu maserasi, artinya keseimbangan antara bahan yang diekstraksi pada bagian dalam sel dengan masuk kedalam cairan, telah tercapai maka proses difusi segera berakhir. Selama maserasi atau proses perendaman dilakukan pengocokan berulang-ulang.

Upaya ini menjamin keseimbangan konsentrasi bahan ekstraksi yang lebih cepat didalam cairan. Sedangkan keadaan diam selama maserasi menyebabkan turunannya perpindahan bahan aktif. Secara teoritis pada suatu maserasi tidak memungkinkan terjadinya ekstraksi absolut. Semakin besar perbandingan simplisia terhadap cairan pengestraksi, akan semakin banyak hasil yang diperoleh (Voigh, 1994).

b. Perkolasi

Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang baru dan sempurna (*Exhaustiva extraction*) ang umumnya dilakukan pada temperatur ruangan. Prinsip perkolasi adalah dengan menempatkan serbuk simplisia pada suatu bejana silinder, yang bagian bawahnya diberi sekat berpori. Proses terdiri dari tahap pengembangan bahan, tahap maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya (penetesan/ penampungan ekstrak), terus menerus sampai diperoleh ekstrak (perkolat) yang jumlahnya 1-5 kali bahan (Depkes RI, 2000).

2. Cara Panas

a. Refluks

Refluks adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya, selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Umumnya dilakukan pengulangan proses pada residu pertama sampai 3-5 kali sehingga dapat termasuk proses ekstraksi sempurna (Depkes RI, 2000).

b. Sokletasi

Sokletasi adalah ekstraksi menggunakan pelarut yang selalu baru yang umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi kontinu dengan jumlah pelarut yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Biomasa ditempatkan dalam wadah soklet yang dibuat dengan kertas saring, melalui alat ini pelarut akan terus direfluks. Alat soklet akan mengkosongkan isinya kedalam labu dasar bulat setelah pelarut mencapai kadar tertentu. Setelah pelarut segar melawati alat ini melalui pendingin refluks, ekstraksi berlangsung sangat efisien dan senyawa dari biomasa secara efektif ditarik kedalam pelarut karena konsentrasi awalnya rendah dalam pelarut (Depkes RI, 2000).

c. Digesti

Digesti merupakan metode maserasi yang menggunakan temperatur hangat selama proses ekstraksinya. Metode ini digunakan untuk simplisia yang tidak boleh diekstraksi pada suhu yang tinggi (Handa, 2008). Dalam buku Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat, digesti adalah maserasi kinetik (dengan pengadukan terus menerus) pada temperatur 40-50°C (Depkes RI, 2000).

d. Infus

Infudasi adalah proses penyarian yang umumnya digunakan untuk menyari zat aktif yang larut dalam air dari bahan nabati, yang dilakukan dengan cara membasahi dengan air. Biasanya dua kali bobot bahan,

kemudian ditambah dengan air secukupnya dan dipanaskan dalam tangas air selama 15-20 menit dengan suhu 90-98°C, sambil sekali-kali diaduk. Untuk mencukupi kekurangan air, ditambahkan melalui ampasnya. Umumnya 100 bagian sari diperlukan 10 bagian bahan (Depkes RI, 1986).

e. Dekok

Dekok merupakan ekstraksi simplisia dengan cara pemanasan dalam volume air dan waktu tertentu, kemudian didinginkan dan disaring (Handa, 2008). Dalam buku Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat, dekok adalah infus pada waktu yang lebih lama dan pada temperatur sampai titik didih air (Depkes RI, 2000). Metode ini digunakan untuk mengekstraksi zat yang larut air dan stabil dalam pemanasan.

## **II.4 *Freeze Drying***

### **II.4.1 Definisi *Freeze Drying***

*Freeze drying* atau pengeringan beku merupakan teknologi pengeringan non termal dengan menggunakan suhu yang rendah (Gaidhani, et al., 2015). Alat yang digunakan dalam teknologi pengolahan ini disebut *freeze dryer* (Shukla, 2011).

Perbedaan pengeringan beku dengan teknologi pengeringan lain adalah mekanisme dalam menghilangkan kandungan air didalam bahan pangan. Penghilangan kandungan air dalam teknologi ini terjadi pada suhu yang rendah, melalui mekanisme sublimasi, langsung dari bentuk fase padat

air (es) ke bentuk gas. Produk pengeringan beku mempunyai beberapa kelebihan diantaranya meminimalkan penyusutan dan perubahan struktural, menghilangkan air lebih cepat, mempertahankan zat gizi dan perubahan minimal pada bau, rasa dan warna (Gaidhani, et al., 2015).

Bahan pangan yang sesuai untuk dilakukan proses pengeringan beku, diantaranya produk pangan dalam bentuk larutan, daging yang sudah diiris tipis, irisan buah/ sayuran, atau buah/sayuran utuh yang berukuran kecil (Hariyadi, 2013).

#### **II.4.2 Prinsip *Freeze Drying***

Prinsip *freeze drying* yaitu mengeringkan bahan pangan dengan menghilangkan kandungan air didalamnya melalui proses sublimasi kandungan air didalam bahan pangan yang sudah menjadi beku kemudian diubah menjadi gas. Sublimasi dapat terjadi ketika tekanan dan suhu permukaan es dibawah *triple point* (4,58 mmHg, 0°C) (Nireesha, et al., 2013).

Terdapat 4 tahap dalam pengolahan pengeringan beku, diantaranya persiapan bahan pangan, pembekuan, pengeringan primer, dan pengeringan sekunder. Tahap pertama dalam pengolahan *freeze drying* adalah persiapan bahan pangan. Pada pengolahan buah, umumnya buah yang mempunyai ukuran besar atau mempunyai kandungan air yang tinggi seperti buah melon, semangka, mangga, nanas, atau jeruk diperlukan proses pengirisan tipis. Proses ini bertujuan untuk mempercepat proses pengeringan. Namun buah yang berukuran kecil dan mempunyai kandungan air yang rendah seperti berry, anggur atau durian dapat langsung diolah. Selain itu, untuk

memperpanjang masa simpan dapat pula ditambahkan bahan lain seperti *bulking agent*, stabilizer, pengawet atau larutan osmotik (Shukla, 2011).

Selanjutnya tahap kedua yaitu pembekuan. Tahap ini dilakukan dengan menurunkan suhu *freeze dryer* hingga  $-40^{\circ}\text{C}$ . Pembekuan bertujuan untuk merubah fase air di dalam buah menjadi fase padat (es) (Shukla, 2011).

Selanjutnya setelah dilakukan pembekuan, pada tahap ketiga adalah proses pengeringan. Proses ini dilakukan dengan dua tahap yaitu Pengerinan primer dan pengeringan sekunder. Pengerinan primer bertujuan untuk menghilangkan kandungan air dalam buah yang telah dibekukan melalui proses sublimasi dengan meningkatkan suhu sampai  $0^{\circ}\text{C}$  serta menurunkan tekanan dalam alat dibawah *triple point* yaitu  $<4,58$  mmHg, yang bertujuan agar gas yang terbentuk saat peningkatan suhu terbang keluar. Setelah kandungan air telah keluar sekitar 95 %, kemudian dilakukan pengeringan sekunder dengan meningkatkan tekanan, dan suhu pada kondisi normal  $35^{\circ}\text{C}$ , dengan tujuan untuk mengkondisikan agar buah yang keluar dari alat tidak dalam kondisi beku atau dapat beradaptasi dengan suhu ruang (Shukla, 2011).

## **II.5 Uraian Umum Antimikroba**

### **II.5.1 Definisi Antimikroba**

Antimikroba adalah bahan-bahan atau obat-obat yang digunakan untuk memberantas infeksi mikroba pada manusia, termasuk golongan ini yang berhubungan dengan bidang farmasi antara lain antibiotika, antiseptika, disinfektansia, preservatif. Adapun antimikroba dapat bersifat, yaitu :

1. Bakteriostatika, yaitu zat atau bahan yang dapat menghambat atau menghentikan pertumbuhan mikroorganisme (bakteri), Fungistatika yaitu zat atau bahan yang dapat menghentikan pertumbuhan fungi, sitostatika terhadap kanker. Dalam keadaan seperti ini jumlah mikroorganisme menjadi stasioner, tidak dapat lagi multiplikasi dan berkembang biak.
2. Bakterisida, yaitu zat atau bahan yang dapat membunuh mikroorganisme (bakteri). Dalam hal ini jumlah mikroorganisme (bakteri) akan berkurang atau bahkan habis, tidak dapat lagi melakukan multiplikasi atau berkembang biak (Djide dan Sartini, 2014).

## **II.5.2 Mekanisme Kerja Antimikroba**

Antimikroba mempunyai mekanisme kerja utama antara lain sebagai berikut (Djide dan Sartini, 2014):

### **1. Penginaktifan enzim tertentu**

Penginaktifan enzim tertentu adalah mekanisme umum dari senyawa antiseptika dan desinfektansia, seperti turunan aldehida, amida, karbanilida, etilen-oksida, halogen, senyawa-senyawa merkuri dan senyawa ammonium kuartener.

### **2. Denaturasi protein**

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



### 3. Mengubah permeabilitas membran sitoplasma bakteri

Cara ini adalah model kerja dari turunan amin dan guanidine, turunan fenol dan senyawa ammonium kuartener. Dengan mengubah permeabilitas membran sitoplasma bakteri, senyawa-senyawa tersebut dapat menyebabkan bocornya konstituen sel yang esensial, sehingga bakteri mengalami kematian.

### 4. Interkalasi ke dalam DNA

Beberapa 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.

### 5. Pembentukan khelat

Beberapa turunan fenol seperti heksoklorofen dan oksikuinolin dapat membentuk khelat dengan ion Fe dan Cu, 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.

### 6. Bersifat sebagai antimetabolit

Antimikroba bekerja memblokir tahap metabolik spesifik mikroba, seperti pada sulfonamida dan trimetoprin. Sulfonamida menghambat pertumbuhan sel dengan menghambat sintesis asam folat oleh bakteri. Sulfonamide secara struktur mirip dengan asam folat, para amino benzoic acid (PABA), dan bekerja secara kompetitif untuk enzim-enzim yang langsung

mempersatukan PABA dan sebagian pteridin menjadi asam dihidropetroat. Trimetoprin secara struktur analog pteridin yang dibagi oleh enzim dihidrofolat reduktase dan bekerja sebagai penghambat kompetitif enzim tersebut yang dapat mengurangi dihidrofolat menjadi tetrahidrofolat.

#### 7. Penghambatan terhadap sintesis dinding sel

Antimikroba golongan ini dapat menghambat sintesis atau menghambat aktivitas enzim yang dapat merusak dinding sel mikroorganisme. Yang termasuk kelompok ini antara lain penisilin, sefalosporin, vankomisin, sikloserin, basitrasin.

#### 8. Penghambatan fungsi permeabilitas membrane sel

Antimikroba bekerja secara langsung pada membrane sel yang mempengaruhi permeabilitas dan menyebabkan keluarnya senyawa intraseluler mikroorganisme (bakteri). Dalam hal ini antimikroba dapat: (1) berinteraksi dengan sterol membrane sitoplasma pada sel jamur seperti Amfoterisin B dan Nistatin, (2) merusak membrane sel bakteri gram negatif, misalnya polimiksin dan kolistin.

#### 9. Penghambatan sintesis protein

Antimikroba disini mempengaruhi fungsi ribosom pada mikroorganisme yang menyebabkan sintesa protein terhambat.

- a. Berinteraksi dengan ribosom 30S, termasuk kelompok ini adalah Aminoglikosido, dan lain-lain. Aminoglikosida yang menyebabkan akumulasi sintesis protein awal yang kompleks. Salah dalam menejemahkan tanda mRNA dan menghasilkan polipeptida yang

abnormal. Tetrasiklin bekerja menghambat ikatan aminoasil-tRNA dengan ribosom mRNA kompleks.

- b. Berinteraksi dengan ribosom 50S, misalnya pada kloramfenikol, linkomisin, klindamisin, eritromisin.

#### 10. Penghambatan asam nukleat

Antimikroba mempengaruhi asam nukleat. Sebagai contoh rifampisin mengikat dan menghambat DNA-*dependent* RNA *polymerase* yang ada pada bakteri. Kuinolon menghambat DNA girase, dan Metronidazole menghambat sintesis DNA.

### **II.6 Metode Pemisahan secara Kromatografi Lapis Tipis**

Kromatografi lapis tipis adalah metode pemisahan berdasarkan sifat fisika dan kimia. Lapisan yang memisahkan terdiri atas bahan berbutir-butir (fase diam), ditempatkan pada penyangga berupa pelat gelas, logam, atau lapisan yang cocok. Campuran yang akan dipisah berupa larutan, ditotolkan berbentuk bercak atau pita (awal), kemudian pelat dimasukkan di dalam bejana tertutup rapat yang berisi larutan pengembang yang cocok (fase gerak), pemisahan terjadi selama perambatan kapiler (pengembangan). Senyawa yang tidak berwarna selanjutnya harus ditampakkan (dideteksi) (Stahl, 1985).

Adsorben merupakan komponen dalam KLT yang berfungsi sebagai fase diam (*stationer phase*). Adsorben yang umum digunakan pada KLT antara lain silika gel, alumina, poliamida, dan kieselguhr. Silika gel banyak digunakan sebagai penjerap dalam lempeng KLT. Prinsip pemisahan pada

lempeng yang menggunakan silika gel adalah interaksi ikatan hidrogen atau dipol dengan permukaan silanol dimana fase gerak yang digunakan adalah zat yang bersifat lipofilik. Zat akan memisah dari silanol berdasarkan tingkat kepolarannya. Alumina adalah adsorben yang bersifat polar seperti silika gel, tetapi memiliki afinitas adsorpsi yang tinggi terhadap karbon ikatan rangkap dan lebih selektif untuk hidrokarbon aromatis dan turunannya. Poliamida merupakan adsorben yang memiliki gugus  $-CO-NH-$  dan menunjukkan afinitas tinggi dan selektif untuk senyawa polar yang dibentuk dari ikatan hidrogen dengan senyawa karbonil (Sherma dan Fried, 2003).

Adsorben pada lempeng KLT tidak hanya berupa satu adsorben, tetapi terdapat pula dalam bentuk campuran, seperti silika gel-alumina, kieselguhr-alumina, alumina-kalsium sulfat, magnesita-kieselguhr, selulosa-silika gel, poliamida-silika gel, poliamida-kieselguhr, dan alumina-selulosa (Sherma dan Fried, 2003).

Dalam kromatografi lapis tipis, fase gerak (*mobile phase*) sering disebut sistem pelarut. Pelarut yang digunakan pada KLT bersifat mudah menguap, viskositasnya rendah, dapat membasahi lapisan lempeng dan tidak melarutkan sampel secara sempurna. Prinsip umum sistem kromatografi dalam hal pemilihan pelarut adalah pelarut yang dipilih seharusnya cocok dengan sampel dan lapisan adsorben yang digunakan. Sehingga pelarut akan berkompetisi dengan zat yang akan dipisahkan (sampel). Zat polar membutuhkan pelarut polar untuk bermigrasi pada sisi lapisan adsorben. Pelarut yang memiliki daya yang lebih besar akan meningkatkan nilai  $R_f$ . Untuk

KLT yang menggunakan silika gel sebagai adsorbennya, pelarut yang digunakan bersifat sedikit polar (Sherma, dan Fried, 2003).

Proses pemisahan campuran sampel dengan cara migrasi fase gerak melewati lapisan lempeng dinamakan pengembangan (elusi). Ketika fase gerak terdiri dari dua atau lebih eluen dengan polaritas yang berbeda, pemisahan eluen akan terjadi. Fenomena ini melibatkan pemisahan eluen oleh lapisan adsorben selama proses pengembangan karena adsorben memiliki afinitas yang lebih kuat untuk eluen yang bersifat lebih polar. Eluen yang kurang polar akan banyak terdapat pada bagian atas lempeng, sedangkan eluen yang lebih polar akan banyak terdapat pada bagian bawah lempeng. Kejenuhan *chamber* memiliki pengaruh yang besar terhadap nilai  $R_f$  dan pemisahan yang terjadi (Fried dan Sherma, 1999). Nilai  $R_f$  dihitung dengan menggunakan perbandingan sebagaimana persamaan sebagai berikut (Gandjar dan Rohman, 2007):

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh senyawa (cm)}}{\text{Jarak yang ditempuh pelarut (cm)}}$$

Nilai  $R_f$  berjangka antara 0,00 – 1,00 dan hanya dapat ditentukan dua desimal. Nilai  $R_f$  dipengaruhi oleh struktur kimia dari senyawa yang sedang dipisahkan, sifat dari penyerap, jenis eluen, dan jumlah cuplikan (Sastrohamidjojo, 1991).

## II.7 KLT-Bioautografi

Menurut Pratiwi (2008), Metode bioautografi merupakan metode spesifik untuk mendeteksi bercak pada kromatogram hasil KLT (Kromatografi

Lapis Tipis) yang memiliki aktivitas antibakteri, antifungi, dan antivirus, sehingga mendekati metode separasi dengan uji biologis.

Keuntungan metode ini adalah sifatnya yang efisien untuk mendeteksi adanya senyawa antimikroba karena letak bercak dapat ditentukan walaupun berada dalam campuran yang kompleks sehingga memungkinkan untuk mengisolasi senyawa aktif tersebut. Kerugiannya adalah metode ini tidak dapat digunakan untuk menentukan KHM dan KBM.

Menurut Djide dan Sartini (2008), bioautografi dapat dibedakan menjadi tiga kelompok yaitu:

a. Bioautografi Langsung

Prinsip kerja dari metode ini adalah suspensi mikroorganisme uji yang peka dalam medium cair disemprotkan pada permukaan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) yang telah disisakan sisa-sisa eluen yang menempel pada lempeng kromatogram. Setelah itu dilakukan inkubasi pada suhu dan waktu tertentu.

Pengeringan kromatogram dilakukan secara hati-hati dengan menggunakan "*hair dryer*" untuk menghilangkan sisa eluen. Senyawa dalam lempeng kromatogram dideteksi dengan menggunakan sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Setelah diketahui letak dan jumlah senyawa aktif yang terpisah atau terisolasi, dengan timbulnya noda (spot) pada lempeng KLT, selanjutnya disemprotkan suspensi bakteri uji sebanyak 5–6 ml di atas permukaan lempeng KLT tadi secara merata.

Besarnya lempeng KLT yang sering digunakan adalah 20×20 cm dan untuk meratakan suspensi bakteri telah disemprotkan dapat menggunakan alat putar atau "roller" yang dilapisi dengan kertas kromatogram (Whatman, Clijton). Lempeng KLT diinkubasi selama (1×24 jam) dalam boks plastik dan dilapisi dengan kertas, kemudian disemprot dengan 5 ml larutan cair TTC (20 mg/ml) atau INT (5 mg/ml), INTB (5 mg/ml) serta MTT (2,5 mg/ml) dan selanjutnya diinkubasi kembali selama 4 jam pada suhu 37°C.

b. Bioautografi Kontak

Metode ini didasarkan atas difusi dari senyawa yang telah dipisahkan dengan kromatografi lapis tipis (KLT) atau kromatografi kertas. Lempeng kromatografi tersebut ditempatkan diatas permukaan medium Nutrien Agar (NA) yang telah diinokulasikan dengan mikroorganisme yang sensitif terhadap senyawa antimikroba yang dianalisis. Setelah 15–30 menit, lempeng kromatografi tersebut dipindahkan diangkat dari permukaan medium. Senyawa antimikroba yang telah berdifusi dari lempeng kromatogram ke dalam media Agar akan menghambat pertumbuhan bakteri setelah diinkubasi pada waktu dan suhu yang tepat sampai noda yang menghambat pertumbuhan mikroorganisme uji tampak pada permukaan membentuk zona yang jernih. Untuk memperjelas dapat digunakan indikator aktivitas dehidrogenase.

c. Bioautografi Pencelupan

Pada umumnya, metode ini dilakukan dengan cara, lempeng kromatografi yang telah dielusi, diletakkan dalam cawan petri, sehingga permukaannya

tertutup oleh medium agar yang berfungsi sebagai *base layer* setelah medium agar memadat, selanjutnya dituang medium yang telah disuspensikan dengan kultur mikroba uji yang berfungsi sebagai *seed layer*. Kemudian diinkubasi pada suhu dan waktu yang sesuai.