

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK
TERPURIFIKASI BUAH SAWO MANILA (*Manikara
zapota* Linn.) TERHADAP BAKTERI PATOGEN
RESISTEN ANTIBIOTIK**

**WA ODE SITTI MUNIRAH
N111 09 011**



**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2013**

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK TERPURNIFIKASI BUAH
SAWO MANILA (*Manikara zapota* Linn.) TERHADAP BAKTERI
PATOGEN RESISTEN ANTIBIOTIK**

SKRIPSI

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

**WA ODE SITI MUNIRAH
N111 09 011**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2013**

PERSETUJUAN

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK TERPURNIFIKASI BUAH SAWO
MANILA (*Manikara zapota* Linn.) TERHADAP BAKTERI PATOGEN
RESISTEN ANTIBIOTIK**

WA ODE SITTI MUNIRAH

N111 09 011

Disetujui oleh:

Pembimbing Utama

Pembimbing Pertama

Dr. Herlina Rante, M.Si, Apt

NIP.19771125 200212 2 003

Abdul Rahim, M.Si., Apt

NIP.19771111 2008121001

Pada tanggal, 19 Juli 2013

PENGESAHAN

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK TERPURIFIKASI BUAH SAWO
MANILA (*Manikara zapota* Linn.) TERHADAP BAKTERI PATOGEN
RESISTEN ANTIBIOTIK**

Oleh :

WA ODE SITTI MUNIRAH

N111 09 011

**Dipertahankan Dihadapan Panitia Penguji Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin
Pada tanggal : 19 Juli 2013**

Panitia Penguji Skripsi :

1. Dra. Rosany Tayeb, M.Si., Apt. (Ketua) :
2. Prof. Dr. Gemini Alam, M.Si., Apt. (Sekretaris) :
3. Dr. Herlina Rante, M.Si, Apt (Ex officio) :
4. Abdul Rahim, M.Si., Apt. (Ex officio) :
5. Nurhasni Hasan, M.Si., Apt. (Anggota) :

Mengetahui :

**Dekan Fakultas Farmasi
Universitas Hasanuddin**

**Prof. Dr. Elly Wahyudin, DEA, Apt.
NIP. 19560114 198601 2 001**

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi ini adalah karya saya sendiri, tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila dikemudian hari terbukti bahwa pernyataan saya ini tidak benar, maka skripsi dan gelar yang diperoleh, batal demi hukum.

Makassar, 19 Juli 2013

Penyusun

Wa Ode Sitti Munirah

"Seorang tidak akan mendapatkan semua ilmu, walaupun ia mencoba mencarinya selama seribu tahun. Lautan ilmu itu sangat dalam, Maka, ambillah yang terbaik saja dari semua hal (Imam Syafi'i)"

Semoga niat ini tetap lurus, semoga menjadi ibadah,

semoga menjadi amal jariyah,

semoga karya ini bermanfaat,

Amin

Karya sederhana ini kupersembahkan kepada Ayahanda Djafar dan ibunda Yustiati, serta kakak terkasih Wa Ode Sitti Munawarah dan adik-adik tercinta La Ode Muhammad Kalbuddin Hipnatiar, La Ode Muhammad Dzulfijar, dan Wa Ode Sitti Munasari. Terimakasih untuk setiap bisikan doa, kasih sayang dan segala dukungan yang selalu diberikan setiap waktu.

UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah, puji syukur kehadiran Allah Yang Maha Kuasa atas segala rahmat, karunia, dan petunjukNya sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir ini sebagai persyaratan untuk menyelesaikan studi di Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin.

Sungguh banyak kendala yang penulis hadapi dalam rangka penyusunan skripsi ini. Namun berkat dukungan dan bantuan berbagai pihak, akhirnya penulis dapat melewati kendala-kendala tersebut. Oleh karena itu, penulis dengan tulus menghaturkan banyak terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada:

1. Orang tua tercinta ayahanda Djafar, ibunda Yustiati, serta saudara terkasih Wa Ode Sitti Munawarah, La Ode Muhammad Qalbuddin Hipnatiar, La Ode Muhammad Dzulfijar dan Wa Ode Sitti Munasari, terimakasih atas setiap doa dan motivasi yang tiada henti diberikan.
2. Pembimbing utama Dr. Herlina Rante, M.Si., Apt. dan pembimbing pertama Abdul Rahim, M.Si., Apt. atas bimbingan dan arahnya dalam menyelesaikan tugas akhir ini.
3. Dekan Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin Prof. Dr. Elly Wahyuddin, DEA., Apt., beserta seluruh staf Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin.

4. Pembimbing Akademik Dra. Rahmawati Syukur, M.Si., Apt. dan seluruh dosen Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin yang telah banyak memberikan ilmu kepada penulis selama masa pendidikan.
5. Ibu Dra. Rosany Tayeb, M.Si., Apt.; Bapak Prof. Dr. Gemini Alam, M.Si., Apt. dan Ibu Nurhasni Hasan, M.Si., Apt. selaku penguji penulis.
6. Kak Haslia S.Si. selaku Laboran Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Universitas Hasanuddin dan Kak Ismail S.Si, Apt selaku Laboran Laboratorium Biofarmaka Farmasi Universitas Hasanuddin.
7. Teman-teman seperjuangan Ginkgo 09 dan semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu segala bantuan, dukungan dan motivasinya, tak lupa penulis sampaikan terima kasih.

Penulis menyadari sepenuhnya atas kekurangan dan keterbatasan mulai dari awal penelitian sampai penulisan karya akhir ini, untuk itu semua saran dan kritikan dalam penyempurnaannya akan penulis terima dengan segala kerendahan hati.

Akhirnya perkenankan penulis memohon maaf atas segala kekhilafan dan kesalahan selama pendidikan sampai selesainya karya akhir ini. Semoga karya akhir ini dapat bermanfaat bagi kita semua.

Makassar, 19 Juli 2013

Wa Ode Sitti Munirah

ABSTRAK

Sawo manila (*Manikara zapota* Linn.) merupakan salah satu tanaman yang secara tradisional digunakan untuk mengobati beberapa macam penyakit salah satunya yaitu infeksi. Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui kemampuan ekstrak yang terpurifikasi dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* resisten antibiotik. Simplisia tersebut diekstraksi dengan etanol menggunakan metode maserasi lalu dipartisi dengan pelarut n-heksan, kloroform, dan etil asetat. Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan menggunakan metode difusi pada medium Nutrien Agar (NA). Hasil pengujian diperoleh ekstrak larut etil asetat lebih aktif terhadap *Escherichia coli* dengan diameter zona hambat 15,96 mm dan ekstrak larut kloroform terhadap *Staphylococcus aureus* dengan diameter zona hambat 14,88 mm pada konsentrasi 20% b/v. Dari hasil uji KLT bioautografi dengan eluen Heksan : Etil asetat (1:4) terdapat dua noda zona hambat pada ekstrak larut etil asetat dengan nilai Rf 0,65 dan 0,5, juga terdapat satu noda zona hambat pada ekstrak larut kloroform dengan nilai Rf 0,84. Hasil karakterisasi senyawa menghambat, bahwa ekstrak larut kloroform diduga merupakan senyawa golongan terpen dan ekstrak larut etil asetat merupakan senyawa golongan terpen dan fenol.

ABSTRACT

Manila sapolida (*Manikara zapota* Linn.) is one of plant which traditionally used to treat several kinds of diseases one of which is infection. The study aims to determine the ability of the purified extract in inhibiting the growth of pathogenic bacteria *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* antibiotic resistant. The sample was extracted with methanol by using maseration method and partitioned with heksane, chloroform, and ethyl acetate. Antibacterial activity is tested by using diffusion method on nutrient agar (NA) medium. The results obtained that the soluble ethyl acetate extract are active to *Escherichia coli* with diameter of inhibitory zone 15.96 mm and soluble chloroform extract is active to *Staphylococcus aureus* with diameter of inhibition zone is of 14.88 mm on concentration 20% b/v respectively. Based on the result of TLC-bioautography test with eluen Heksan : Ethyl acetate (1 : 4) there are two inhibition zone on soluble ethyl acetate extract with Rf value 0,65 and 0,5 also one inhibition zone on soluble chloroform extract with Rf value 0,84. Results of characterization inhibiting compounds, it's assumed that soluble chloroform extract is class terpene compounds and soluble ethyl acetate extract a class terpenes and phenolic compounds.

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN PENUNJUK SKRIPSI	ii
HALAMAN PERSETUJUAN	iii
PENGESAHAN	iv
PERNYATAAN	v
PERSEMBAHAN.....	vi
UCAPAN TERIMA KASIH.....	vii
ABSTRAK	ix
ABSTRACT	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
DAFTAR ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN.....	xvii
BAB I PENDAHULUAN	1
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5

II.1 Uraian Tumbuhan.....	5
II.1.1 Klasifikasi Tumbuhan	5
II.1.2 Nama Daerah Tumbuhan	5
II.1.3 Morfologi Tumbuhan	5
II.1.4 Kegunaan Tumbuhan.....	6
II.1.5 Kandungan Kimia.....	6
II.2 Metode Ekstraksi Bahan Alam.....	6
II.2.1 Defenisi Ekstrak.....	6
II.2.2 Defenisi Ekstraksi.....	7
II.2.3 Jenis-Jenis Ekstraksi.....	7
II.2.4 Ekstraksi Secara Maserasi.....	7
II.3 Tinjauan Umum Antimikroba.....	8
II.3.1 Antimikroba.....	8
II.3.2 Mekanisme Antimikroba.....	9
II.3.3 Antibiotik.....	16
II.3.4 Mekanisme Resistensi.....	17
II.4 Uraian Bakteri.....	19
II.4.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	19

II.4.2 <i>Escherichia coli</i>	20
II.5 Pengujian Secara Mikrobiologi.....	21
II.5.1 Metode Dilusi.....	21
II.5.2 Metode Difusi.....	21
II.6 Metode Pemisahan.....	22
II.6.1 Kromatografi Lapis Tipis (KLT).....	22
II.6.2 KLT Bioautografi.....	24
BAB III PELAKSANAAN PENELITIAN	25
III.1 Penyiapan Alat dan Bahan	25
III.2 Penyiapan dan Pengolahan Sampel	25
III.2.1 Pengambilan Sampel.....	25
III.2.2 Pengolahan Sampel.....	26
III.2.3 Ekstraksi Sampel.....	26
III.2.4 Partisi Ekstrak Awal.....	26
III.2.5 Pembuatan Larutan Ekstrak.....	27
III.3 Sterilisasi Alat	27
III.4 Pembuatan Medium	28
III.4.1 Medium Nutrien Agar (NA).....	28

III.4.2 Medium Nutrien Broth (NB).....	28
III.5 Peremajaan Bakteri Uji	29
III.6 Pengujian Daya Hambat	29
III.7 Prosedur Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	29
III.8 Pengujian KLT Bioautografi	30
III.9 Identifikasi	30
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	31
IV.1 Hasil Penelitian	31
IV.2 Pembahasan	34
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	47
V.1 Kesimpulan	47
V.2 Saran	47
DAFTAR PUSTAKA	48
LAMPIRAN-LAMPIRAN	52

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Hasil pengukuran diameter zona hambat ekstrak buah sawo.....	32
2. Hasil diameter zona hambat ekstrak buah sawo manila (<i>Manikara zapota</i> Linn.) terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> resisten antibiotik	32
3. Profil KLT bioautografi dan identifikasi ekstrak larut kloroform buah sawo manila (<i>Manikara zapota</i> Linn.).....	33
4. Profil KLT bioautografi dan identifikasi ekstrak larut Etil asetat buah sawo manila (<i>Manikara zapota</i> Linn.).....	33

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Mekanisme terjadinya resistensi	18
2. Hasil uji daya hambat ekstrak etanol buah sawo manila (<i>Manikara zapota</i> Linn.)	36
3. Hasil uji daya hambat ekstrak larut n-heksan buah sawo manila (<i>Manikara zapota</i> Linn.)	37
4. Uji daya hambat ekstrak buah sawo manila (<i>Manikara zapota</i> Linn.) terhadap <i>Escherichia coli</i>	38
5. Uji daya hambat ekstrak buah sawo manila (<i>Manikara zapota</i> Linn.) terhadap <i>Staphylococcus aureus</i>	39
6. Histogram zona hambat ekstrak buah sawo manila terhadap <i>Escherichia coli</i>	42
7. Uji KLT bioautografi ekstrak Buah sawo maila (<i>Manikara zapota</i> Linn.).....	43
8. Uji KLT bioautografi ekstrak Buah sawo manila (<i>Manikara zapota</i> Linn.)	43
9. Hasil Identifikasi senyawa dalam ekstrak larut kloroform.buah sawo manila (<i>Manikara zapota</i> Linn.).....	44
10. Hasil identifikasi senyawa dalam ekstrak larut etil asetat .buah sawo manila (<i>Manikara zapota</i> Linn.)	45
11. Foto Tumbuhan Sawo manila (<i>Manikara zapota</i> Linn.)	53
12. Foto ekstrak Sawo manila (<i>Manikara zapota</i> Linn).....	54
13. Foto profil KLT dan identifikasi senyawa dengan reagen semprot	54
14. Uji kepekaan bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> terhadap beberapa golongan antibiotik.....	57
15. Uji kepekaan bakteri <i>Escherichia coli</i> terhadap beberapa golongan antibiotik.	57

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Alur Penelitian	52
2. Foto Penelitian.....	53
3. Bukti Bakteri Resisten.....	55

DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN

Lambang/singkatan	Arti
g	gram
mg	miligram
μg	mikrogram
μl	mikroliter
mm	milimeter
UV	Ultraviolet
KLT	Kromatografi Lapis Tipis
Rf	Retardation factor

BAB I

PENDAHULUAN

Di negara berkembang seperti Indonesia, penyakit infeksi merupakan salah satu penyakit yang sering ditemui dan dapat menyebabkan kematian sampai sepuluh juta orang tiap tahun, yang mana banyak anak-anak meninggal akibat infeksi saluran pernapasan dan diare yang disebabkan oleh virus dan bakteri (1).

Infeksi merupakan invasi dan pembiakan mikroorganisme pada jaringan tubuh, yang dapat menyebabkan cedera seluler lokal akibat kompetisi metabolisme, toksin yang dihasilkan oleh mikroorganisme, replikasi intraseluler, atau respon antigen-antibodi (2). Salah satu kategori penyebab infeksi adalah bakteri yang biasa disebut bakteri patogen (3). Beberapa penyakit yang disebabkan oleh bakteri patogen yaitu pneumonia, diare, infeksi saluran urin, meningitis, tuberkulosis, dan masih banyak lagi (4). Salah satu obat andalan untuk mengatasi infeksi adalah antimikroba antara lain antibakteri/antibiotik, antijamur, antivirus, antiprotozoa. Antibiotik merupakan obat yang paling banyak digunakan pada infeksi yang disebabkan oleh bakteri (5).

Antibiotika adalah suatu substansi kimia yang diperoleh dari, atau dibentuk oleh berbagai spesies mikroorganisme, yang dalam konsentrasi rendah mampu menghambat pertumbuhan mikroorganisme lainnya (6). Beberapa antibiotik yang biasa digunakan untuk terapi infeksi yaitu penisilin, sefalosporin, kloramfenikol, siprofloksasin, dan lain-lain (7).

Berbagai studi menemukan bahwa sekitar 40% sampai 62% antibiotik digunakan secara tidak tepat untuk penyakit-penyakit yang sebenarnya tidak memerlukan antibiotik (8). Pada penelitian kualitas penggunaan antibiotik diberbagai bagian rumah sakit ditemukan 30% sampai dengan 80% tidak didasarkan pada indikasi. Intensitas penggunaan antibiotik yang relatif tinggi menimbulkan berbagai permasalahan dan merupakan ancaman global bagi kesehatan terutama resistensi bakteri terhadap antibiotik (5).

Istilah resisten itu menunjukkan bahwa suatu mikroorganisme sudah tidak peka terhadap suatu zat atau sediaan antimikroba atau antibiotika, sehingga akan membawa masalah dalam terapi atau bahkan menggagalkan terapi (9). Pada awalnya resistensi terjadi ditingkat rumah sakit, tetapi lambat laun juga berkembang dilingkungan masyarakat, khususnya *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Kasus resistensi banyak terjadi di Indonesia, telah dilaporkan bahwa bakteri *Escherichia coli* 62,5% resisten terhadap antibiotik golongan aminoglikosida, 57,1% golongan sefalosporin, dan 100% golongan penisilin (10). Sedangkan *Staphylococcus aureus* 33,5% resisten terhadap antibiotik golongan aminoglikosida, 100% terhadap golongan penisilin, dan 100% terhadap antibiotika lain yaitu kloramfenikol serta siprifloksasin (10).

Di masyarakat banyak digunakan berbagai macam tanaman untuk mengobati infeksi yang disebabkan oleh mikroorganisme, salah satunya yaitu sawo manila (*Manikara zapota* Linn.) (11). sawo manila digunakan

secara tradisional untuk mengobati penyakit diare dan demam tifoid. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa ekstrak air daun sawo manila (*Manikara zapota* Linn.) dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* (12). Osman dkk (2011) menyatakan bahwa ekstrak etil asetat daun sawo manila (*Manikara zapota* Linn.) efektif terhadap bakteri *Escherichia coli* pada konsentrasi ekstrak 300 µg/disk, 600 µg/disk, dan 900 µg/disk serta memiliki nilai MIC (*Minimum Inhibitor Concentration*) 512 µg/ml (13). Pada dasarnya kandungan kimia dari daun dan buah sawo manila sama yaitu terpenoid, flavonoid, tannin, polifenol dan glikosida, yang berpotensi menghasilkan aktivitas antibakteri baik gram positif maupun gram negatif. (14,15).

Berdasarkan beberapa uraian di atas, maka dapat diajukan suatu permasalahan yaitu, apakah ekstrak awal buah sawo manila (*Manikara zapota* Linn.) yang telah dipartisi menggunakan tiga pelarut dengan kepolaran berbeda mampu menghambat pertumbuhan bakteri gram positif *Staphylococcus aureus* dan gram negatif *Escherichia coli* yang telah mengalami resisten terhadap beberapa golongan antibiotik.

Sehubungan dengan hal tersebut maka telah dilakukan penelitian tentang uji aktivitas antibakteri ekstrak terpurifikasi buah sawo manila (*Manikara zapota* Linn.) terhadap bakteri patogen resisten antibiotik.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui apakah ekstrak terpurifikasi buah sawo manila (*Manikara zapota* Linn.) dapat

menghambat pertumbuhan bakteri patogen *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* yang telah resisten terhadap antibiotik.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Uraian Tumbuhan

II.1.1 Klasifikasi Tumbuhan

Kerajaan : Plantae

Divisi : Spermatophyta.

Anak divisi : Angiospermae

Kelas : Dicotyledonae

Anak kelas : Sympetalae

Bangsa : Ebenales

Suku : Sapotaceae

Marga : Achras

Jenis : *Achras zapota* Linn.

Sinonim : *Manikara zapota* Linn, *Manikara acras* Linn. (16,17)

II.1.2 Nama Daerah

Sawo manila di pulau jawa biasa disebut dengan Sabu manela (Madeira), sawo manila (Sunda) dan sawo manila (Jawa Tengah). Di pulau Sumatra disebut sawo manila (Melayu), di Sulawesi sawo manila (Makassar), sawo manila (bugis) dan dikenal dengan sabo jawa di Bali.

II.1.3 Morfologi Tumbuhan

Pohon yang berwarna hijau, dengan percabangan tegak dan memencar, serta tinggi dapat mencapai 30 meter. Batangnya bergetah, daunnya berseling dan berbentuk bulat telur-jorong sampai lonjong.

Bunga-bunganya menyendiri dan sering bergantung, muncul pada ketiak daun dan sering berada pada bagian atas ranting. Buahnya berbentuk bulat telur atau jorong, berukuran 3-8 cm x 3-6 cm, kulit buahnya tipis dan berwarna kecoklatan, daging buahnya bertekstur lembut, berwarna coklat kekuningan, rasanya manis. Biji 0-6 butir perbuah, berwarna hitam mengkilat (18).

II.1.4 Kegunaan Tumbuhan

Hampir semua bagian dari Sawo manila bermanfaat, batangnya digunakan sebagai antikanker, antibakteri, dan antipiretik. Daunnya sebagai analgetik. Buahnya dapat dikonsumsi dan bersifat antioksidan, sedangkan bijinya dapat digunakan sebagai antihelmentik dan antidiuretik (11, 12, 13).

II.1.5 Kandungan Kimia

Sawo manila memiliki kandungan kimia yang hampir sama pada setiap bagian tanaman, yaitu terpenoid, flavonoid, tannin, polifenol dan glikosida (14, 15).

II.2 Metode Ekstraksi Bahan Alam

II.2.1 Defenisi Ekstrak

Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (19).

II.2.2 Defenisi Ekstraksi

Ekstraksi yaitu suatu proses untuk menarik komponen kimia yang terdapat dalam simplisia. Proses ini didasarkan atas perpindahan massa komponen zat padat yang ada dalam simplisia ke dalam pelarut organik. Setelah pelarut menembus lapisan permukaan, dinding sel zat padat yang terlarut, berdifusi karena faktor perbedaan konsentrasi dalam sel dan pelarut organik di luar sel, proses ini berselang terus-menerus sampai terjadi keseimbangan antara konsentrasi cairan zat aktif di dalam dan di luar sel (20).

II.2.3 Jenis-Jenis Ekstraksi

Pada umumnya ekstraksi dibedakan menjadi dua, yaitu (20):

1. Ekstraksi dengan pemanasan yaitu refluks, infundasi, soxhletasi dan destilasi uap.
2. Ekstraksi tanpa pemanasan yaitu maserasi dan perkolasi.

II.2.4 Ekstraksi Secara Maserasi

Maserasi merupakan cara penyarian yang sederhana. Maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari. Cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif, zat aktif akan larut, dan karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel dengan yang di luar sel, maka larutan yang terpekat didesak ke luar. Peristiwa tersebut berulang sehingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar sel dan di dalam sel. Maserasi digunakan untuk penyarian simplisia yang

mengandung zat aktif yang mudah larut dalam cairan penyari, tidak mengandung zat yang mudah mengembang dalam cairan penyari, tidak mengandung benzoin, stirak dan lain-lain (20).

Keuntungan cara penyarian dengan maserasi adalah cara pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana dan mudah diusahakan. Kerugian cara maserasi adalah pengerjaannya lama dan penyariannya kurang sempurna (20).

Maserasi pada umumnya dilakukan dengan cara : 10 bagian simplisia dengan derajat kehalusan yang cocok dimasukkan ke dalam bejana, kemudian dituangi dengan 75 bagian cairan penyari, ditutup dan dibiarkan selama 5 hari terlindung dari cahaya, sambil berulang-ulang diaduk. Setelah 5 hari sari diserakai, ampas diperas. Ampas ditambah cairan penyari secukupnya diaduk dan diserakai sehingga diperoleh seluruh sari sebanyak 100 bagian. Bejana ditutup, dibiarkan ditempat sejuk, terlindung dari cahaya, selama 2 hari. Kemudian endapan dipisahkan (20).

II.3 Tinjauan Umum Antimikroba

II.3.1 Antimikroba

Antimikroba adalah bahan-bahan atau obat-obat yang digunakan untuk memberantas infeksi mikroba pada manusia.

Antimikroba dapat bersifat (21):

1. Bakteriostatik yaitu zat atau bahan yang dapat menghambat atau menghentikan pertumbuhan mikroorganisme (bakteri).

Fungistatika yaitu zat atau bahan yang dapat menghentikan pertumbuhan fungi.

2. Bakteriosida 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.

II.3.2 Mekanisme Antimikroba

Penghambatan aktivitas antimikroba oleh komponen bioaktif tanaman dapat disebabkan oleh beberapa faktor antara lain: 1. Gangguan pada senyawa penyusun dinding sel, 2. Peningkatan permeabilitas dinding sel, 3. Menginaktivasi enzim metabolik, 4. Destruksi atau kerusakan fungsi material genetik (22).

Terjadinya proses tersebut diatas karena pelekatan senyawa antimikroba atau senyawa tersebut berdifusi kedalam sel. Kerusakan bakteri merupakan hasil interaksi senyawa antibakteri dengan bagian tertentu pada sel bakteri. Interaksi senyawa antibakteri tersebut menyebabkan sejumlah perubahan atau kerusakan pada sel bakteri yang berpengaruh pada pola inaktivasi bakteri. Pada dosis yang tidak mematikan, bakteri akan mengalami luka, terjadi setelah perubahan dan kerusakan struktur sel bakteri yang akhirnya dapat mempengaruhi fungsi metabolisme sel. Pada kerusakan yang parah akan menyebabkan kematian, bentuk dan besarnya perubahan atau kerusakan struktur sel dipengaruhi oleh senyawa antibakteri, jenis bakteri dan konsentrasi yang

digunakan. Perubahan dan kerusakan struktur sel oleh senyawa antibakteri dapat berupa perubahan morfologi sel, perubahan ultrastruktur sel, ukuran sel, kebocoran dinding sel, dan membran sel, ketebalan dinding sel dan penampakan sitoplasma (23).

Pengaruh Komponen Antibakteri Terhadap Sel Bakteri

1. Menghambat Sintesis Dinding Sel

Sel bakteri dilindungi oleh dinding sel yang terdiri dari peptidoglikan, ruang periplasma yang merupakan tempat enzim-enzim ekstraseluler dan membran sitoplasma yang terlibat dalam proses respirasi. peptidoglikan tersusun dari N-asetilglukosamin dan N-asetilmuramat yang saling berikatan satu sama lain serta asam-asam amino L-alanin, D-alanin, D-glutamat dan lisin. Sintesis dinding sel melibatkan sejumlah enzim untuk menggabungkan fosfoenolpiruvat dengan N-asetilglukosamin. Lapisan peptidoglikan merupakan suatu molekul raksasa. *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri gram positif yang memiliki 40 lapisan peptidoglikan yang merupakan 50% dari bahan dinding sel, sedangkan pada gram negatif hanya ada 1-2 lapisan peptidoglikan dan merupakan 5-10% dari bahan dinding sel. Setiap zat yang menghambat salah satu langkah dalam biosintesis peptidoglikan akan menyebabkan dinding sel bakteri yang tumbuh menjadi lemah dan sel akan mengalami lisis (3).

Membran sel yang mengalami kebocoran parsial atau gangguan fungsi permeabilitas tidak menyebabkan kematian sel mikroba tetapi

diduga hanya memperlambat proses metabolik dalam sel mikroba sehingga hanya menghambat pertumbuhan sel. Minyak atsiri dapat menghambat enzim yang terlibat dalam produksi energi dan pembentukan komponen struktural sehingga pembentukan dinding sel bakteri, alisin pada bawang diketahui dapat menghambat enzim yang mempunyai peranan utama dalam metabolisme baik enzim yang memiliki gugus S-H maupun beberapa yang tidak memiliki gugus S-H (24).

Penghambatan komponen antibakteri adalah kemampuan suatu senyawa antibakteri untuk mempengaruhi dinding sel mikroba, mekanisme ini dapat disebabkan oleh adanya akumulasi komponen lipofilat yang terdapat pada dinding sel atau membran sehingga menyebabkan perubahan komposisi penyusun dinding sel. Terjadinya akumulasi senyawa antibakteri dipengaruhi oleh bentuk tak terdisosiasi, pada konsentrasi rendah molekul-molekul fenol yang terdapat pada minyak *thyme* kebanyakan berbentuk tidak terdisosiasi, lebih hidrofobik, dapat mengikat daerah hidrofobik membran protein, dan dapat melarut baik pada fase lipid dari membran bakteri. Dengan adanya mekanisme ini dapat dinyatakan bahwa semakin banyak bentuk tak terdisosiasi maka senyawa antibakteri semakin efektif sifat antibakterinya (24).

Antibiotik yang termasuk dalam kelompok ini ialah penisilin, sefalosporin, basitrasin, vankomisin, dan siklosterin. Siklosterin menghambat reaksi yang paling dini dalam proses sintesis dinding sel, diikuti berturut turut basitrasin, vankomisin dan diakhiri oleh penisilin dan

sefalosporin yang menghambat reaksi terakhir (transpeptidasi). Oleh karena itu tekanan osmotik dalam sel kuman lebih tinggi dari pada di luar sel maka kerusakan dinding sel kuman akan menyebabkan terjadinya lisis, yang merupakan dasar efek bakterisidal pada kuman yang peka (25).

2. Antimikroba yang Mengganggu Keutuhan Membran Sel Mikroba

Komponen bioaktif dapat menyerang membran sitoplasma dan mempengaruhi integritasnya. Kerusakan pada membran ini dapat mengakibatkan peningkatan permeabilitas dan terjadinya kebocoran sel, yang diikuti dengan keluarnya materi intraseluler. Mekanisme kerja minyak atsiri dan senyawa fenol adalah mengganggu lapisan fosfolipid dari membran sel yang mengakibatkan peningkatan permeabilitas dan kehilangan unsur pokok penyusun sel. Reaksi antara komponen membran fosfolipid dengan minyak atsiri atau flavonoid mengakibatkan perubahan komposisi asam lemak dan kandungan fosfolipid membran, yang diikuti dengan pembengkakan sel. Selanjutnya terjadi kerusakan membran sitoplasma yang mengakibatkan keluarnya komponen intraseluler dari *E.Coli*. Adanya bahan yang terkandung di dalam sel menunjukkan pertahanan permeabilitas lemah atau rusak dan selanjutnya menghambat ikatan ATPase pada membran. Membran sel mempunyai barrier osmotik untuk berdifusi bebas diantara lingkungan luar dan dalam sel. Membran sitoplasma melakukan fungsi pengangkutan aktif sehingga dapat mengendalikan komponen internal sel. Bila integritas fungsi membran sitoplasma terganggu, makromolekul dan ion-ion akan lolos dari sel

sehingga terjadi kerusakan atau kematian sel (26). Beberapa senyawa antibakteri dapat merusak satu atau lebih fungsi tersebut dan menyebabkan gangguan utama pada kelangsungan hidup sel, aksi senyawa antibakteri yang memiliki sasaran utama membran sel tersebut tidak tergantung pada fase pertumbuhan sel, dan dengan segera memulai aksinya ketika sel dan antibakteri saling kontak. Kebocoran sel bakteri dapat disebabkan karena rusaknya ikatan hidrofobik komponen penyusun membran sel seperti protein, fosfolipid serta larutnya komponen-komponen yang bersifat hidrofilik, hal ini disebabkan karena meningkatnya permeabilitas membran sel dan memungkinkan masuknya senyawa-senyawa fenol dan ion-ion organik dalam sel, serta keluarnya substansi sel seperti protein dan asam nukleat yang berakibat kematian sel (27).

Antibiotik yang termasuk dalam kelompok ini adalah polimiksin, golongan polien serta berbagai antimikroba kemoterapeutik. Polimiksin sebagai senyawa ammonium-kuartener dapat merusak membran sel setelah bereaksi dengan fosfat pada fosfolipid membran sel mikroba. Polimiksin tidak efektif pada bakteri gram-positif karena jumlah fosfor bakteri ini rendah. Antibiotik polien bereaksi dengan struktur sterol yang terdapat pada membran sel fungus sehingga mempengaruhi permeabilitas selektif membran tersebut. Bakteri tidak sensitif terhadap antibiotik polien, karena tidak memiliki struktur sterol pada membran selnya. Antiseptik yang mengubah tegangang permukaan dapat merusak permeabilitas

selektif dari membran sel menyebabkan keluarnya berbagai komponen penting dari dalam sel mikroba yaitu protein, asam nukleat, nukleotida dan lain-lain (25).

3. Antimikroba yang Menghambat Sintesis Asam Nukleat dan Protein Sel Mikroba

Sintesis protein adalah pembentukan rantai polipeptida oleh asam-asam amino melalui ikatan peptida, proses sintesis tersebut terdiri atas beberapa tahap seperti: inisiasi, pengabungan asam-asam amino, pembentukan ikatan peptida, translokasi dan terminasi. Beberapa senyawa antibakteri mempunyai komponen bioaktif yang dapat menghambat sintesis protein bakteri. Komponen bioaktif tersebut bereaksi dengan komponen sel ribosom 50S yang akan membentuk kompleks pada tahap inisiasi (tahap awal sintesis protein), sehingga menstimulasi pembacaan yang salah. Selanjutnya terjadi penyimpangan pada ribosom, yang mengakibatkan terjadinya sintesis protein, dilanjutkan dengan pasangan yang tidak tepat yang akhirnya mengganggu pembentukan protein (28).

Komponen bioaktif dapat mengganggu pembentukan asam nukleat (DNA dan RNA), sehingga transfer informasi genetik akan terganggu karena komponen akan menghambat aktivitas enzim RNA polimerase dan DNA polimerase, yang selanjutnya akan menginaktivasi atau merusak materi genetik dan mengganggu proses pembelahan sel untuk pembiakan. Terjadinya kerusakan sel bakteri selain ditandai dengan

berkurangnya aktivitas metabolisme yang mengakibatkan terganggunya pertumbuhan bakteri tersebut, juga ditandai adanya kebocoran protein (sebagai senyawa pembangun struktur inti sel) keluar sel atau medium sekitarnya (26).

4. Menghambat Enzim-Enzim Metabolik Sel Mikroba

Enzim yang berperan dalam metabolisme dan pertumbuhan sel mikroba dapat dihambat aktivitasnya oleh komponen antibakteri yang berakibat terganggunya aktivitas maupun pertumbuhan mikroba. Konsentrasi antibakteri yang tinggi dapat menyebabkan koagulasi enzim. Beberapa gangguan aktivitas enzim dapat juga terjadi pada saat mikroba mensintesis asam dihidrofolat dari p-aminobenzoat. Pada sintesis p-aminobenzoat dapat terjadi penghambatan karena adanya sulfonamid yang akan menghambat enzim dihidroptroat (25).

Dengan terpengaruhnya sistem enzim akan mempengaruhi produksi energi penyusun sel dan sintesis komponen secara struktural. Senyawa fenol dapat bereaksi dengan enzim dihidrogenase sehingga mengakibatkan hilangnya aktivitas enzim tersebut (26).

Komponen antibakteri dapat menghambat pertumbuhan atau membunuh mikroorganisme melalui inaktivasi enzim-enzim metaboliknya, senyawa antibakteri sulfit, nitrit, dan asam benzoate dapat menginaktivasi berbagai enzim metabolik bakteri. Nitrit dapat menghambat sistem enzim fosfat dehidrogenase, sehingga mengakibatkan reduksi ATP dan ekskresi piruvat dalam bakteri *S aureus* (28). Sulfit dapat berikatan dengan

glutation dari berbagai enzim membentuk tiosulfonat, reaksi ini dapat menginaktivasi enzim-enzim yang memiliki ikatan disulfida. Asam benzoat dapat menghambat aktivitas a-ketoglutarat dehidrogenase dan suksinat dehidrogenase sehingga menghambat konversi a-ketoglutarat menjadi suksinil Co-A dan suksinat menjadi fumarat. Senyawa tersebut dapat juga menghambat aktivitas enzim 6- fosfofruktokinase yang terlibat dalam oksidasi glukosa (22).

II.3.3 Antibiotik

Antibiotika adalah suatu substansi kimia yang diperoleh dari, atau dibentuk oleh berbagai spesies mikroorganisme, yang dalam konsentrasi rendah mampu menghambat pertumbuhan mikroorganisme lainnya. Dari sekian banyak antibiotika yang telah berhasil ditemukan, hanya beberapa saja yang cukup tidak toksik untuk dapat dipakai dalam pengobatan. Antibiotika yang kini banyak dipergunakan, kebanyakan diperoleh dari genus *Bacillus*, *Penicillium* dan *Streptomyces* (6).

Antibiotika yang ideal sebagai obat harus memenuhi syarat sebagai berikut (4,6) :

1. Mempunyai kemampuan untuk mematikan atau menghambat pertumbuhan mikroorganisme yang luas (*Board spectrum antibiotic*).
2. Tidak menimbulkan terjadinya resistensi dari mikroorganisme patogen.
3. Tidak menimbulkan efek samping yang buruk pada host, seperti reaksi alergi, kerusakan syaraf, iritasi lambung dan sebagainya.

4. Tidak mengganggu keseimbangan flora normal dari host seperti flora usus dan flora kulit.
5. Larut dalam air serta stabil
6. Tetap aktif dalam plasma, cairan badan atau eksudat
7. Bactericidal level di dalam tubuh, cepat dicapai dan bertahan dalam waktu lama.

II.3.4 Mekanisme resistensi

Adapun mekanisme terjadinya resistensi mikroba terhadap antibiotik yaitu :

1. Modifikasi antibiotik

1.1 Inaktivasi Enzim

Salah satu mekanisme resistensi yang paling umum, terjadi pada saat organisme secara spontan memproduksi enzim yang mendegradasi antibiotik. Banyak strain dari *Staphylococcus aureus* memproduksi enzim ekstraseluler, β -laktamase, yang membuka cincin β -laktam penisilin, sehingga menginaktivasinya. Banyak organisme lain mampu mengekspresikan enzim yang mendegradasi penisilin dan sefalosporin. Diantara organisme tersebut termasuk *Escherichia coli*, *Hemophilus influenza*, dan *Pseudomonas* spp (7).

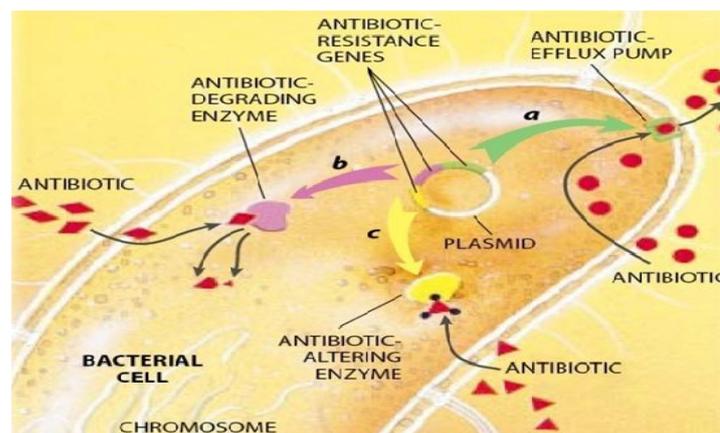
1.2 Penambahan enzim

Bakteri dapat mengekspresikan enzim yang dapat menambah suatu gugus kimia ke dalam antibiotik, sehingga menghambat aktivitas antibiotik tersebut. Bakteri menjadi resisten terhadap aminoglikosida dengan

mengekspresikan enzim yang menginaktivasi antibiotik dengan menambahkan gugus asetil, amino, atau adenosin ke dalam molekul antibiotik. Enzim resistensi aminoglikosida dimiliki oleh bakteri gram positif seperti *Staphylococcus aureus*, dan bakteri gram negatif seperti *Pseudomonas spp* (7)..

2. Impermeabilitas

Beberapa bakteri secara alami resisten terhadap antibiotik karena *envelope* selnya impermeabel terhadap antibiotik tertentu. Aminoglikosida memasuki bakteri dengan mekanisme transport yang bergantung pada oksigen dan karena itu memiliki sedikit efek dalam melawan organisme anaerob (7).



Gambar 1. Mekanisme terjadinya resistensi

(sumber : http://www.formatexinfo/microbiology_3/book/1251-1259.pdf)

3. Mekanisme Efluks

Bakteri, contohnya *Escherichia coli* dapat menjadi resisten terhadap tetrasiklin dengan adanya protein membran dalam yang secara aktif memompa antibiotik keluar dari sel. Streptococcus dapat menjadi resisten terhadap mikrolida dengan menggunakan pompa efluks (7).

4. Jalur Alternatif

Mekanisme lainnya yang sering ditemukan adalah bakteri membuat suatu jalur alternatif untuk menghindari blokade metabolisme akibat antibiotik. *Staphylococcus aureus* menjadi resisten terhadap metisilin atau flukloksasilin jika mendapat gen *mca*, gen ini mengkode protein pengikat penisilin alternatif (*alternative penicillin-binding protein*) yang tidak dihambat oleh metisilin. Walaupun komposisi dinding selnya berubah, organisme ini masih dapat bermultiplikasi (7).

5. Perubahan Lokasi Target

Rifampisin bekerja dengan menghambat subunit β dari RNA polymerase. Resistensi terjadi saat gen RNA polymerase mengalami perubahan akibat mutasi titik inserasi, atau delesi. RNA polymerase yang baru tidak dihambat oleh rifampisin sehingga muncul resistensi (7).

II.4 Uraian Bakteri

II.4.1 *Staphylococcus aureus*

Klasifikasi *Staphylococcus aureus* disusun sebagai berikut (30):

Kerajaan	: Protista
Filum	: Schizophyta
Kelas	: Bacteria
Bangsa	: Eubacteriales
Suku	: Micrococcaceae
Marga	: <i>Staphylococcus</i>
Jenis	: <i>Staphylococcus aureus</i>

Berbentuk coccus dan merupakan gram positif, memiliki formasi staphylae, mengeluarkan endotoksin, tidak mampu bergerak serta tidak mampu membentuk spora, fakultatif anaerob, sangat tahan terhadap pengeringan, mati pada suhu 60⁰C (enam puluh derajat Celcius) setelah enam puluh menit. Merupakan flora normal pada kulit dan saluran pernapasan bagian atas. Pada pemeriksaan koloninya berwarna kuning emas. Di alam terdapat pada tanah, air, dan debu di udara (4).

Penyakit yang Ditimbulkan

Menimbulkan infeksi bernanah dan abses, infeksiya akan lebih berat bila menyerang anak-anak, usia lanjut dan orang yang daya tahan tubuhnya menurun, seperti penderita diabetes mellitus, luka bakar dan AIDS. *Staphylococcus aureus* dapat menyebabkan penyakit seperti infeksi pada folikel rambut, bisul, infeksi pada luka, meningitis, endokarditis, pneumonia, pyelonefritis, osteomyelitis(4).

II.5.2 *Escherichia coli*

Klasifikasi *Escherichia coli* disusun sebagai berikut (30) :

Kerajaan : Protista
Filum : Schizophyta
Kelas : Bacteria
Bangsa : Eubacteriales
Suku : Enterobacteriaceae
Marga : Escherichia
Jenis : *Escherichia coli*

Bakteri ini berbentuk batang , gram negatif, fakultatif aerob, tumbuh baik pada media sederhana. Dapat melakukan fermentasi laktosa dan fermentasi glukosa serta menghasilkan gas. *Escherichia coli* merupakan flora normal, hidup komersil di dalam kolon manusia dan diduga membantu pembuatan vitamin K (4).

Penyakit yang Ditimbulkan

Escherichia coli merupakan flora normal dalam usus manusia dan akan menimbulkan penyakit bila masuk ke dalam organ atau jaringan lain. *Escherichia coli* dapat menimbulkan pneumonia, endocarditis, infeksi pada luka-luka dan abses pada berbagai organ. Merupakan penyebab utama meningitis pada bayi yang baru lahir dan penyebab infeksi tractus urinarius (*pyelonephritis, cystitis*) pada manusia yang dirawat dirumah sakit (*nosocomial inferction*) (4).

II.6 Pengujian Secara Mikrobiologi

II.6.1 Metode Dilusi

Prinsip pengujian antibiotika dengan metode ini adalah membandingkan derajat hambatan pertumbuhan mikroorganisme uji oleh dosis antibiotika yang diuji terhadap hambatan yang sama oleh dosis antibiotika baku pembanding dalam media cair (31).

II.6.2 Metode Difusi

Difusi adalah proses perpindahan molekul secara acak dari satu posisi ke posisi lain. Cakram kertas saring atau silinder tidak beralas yang mengandung obat dalam jumlah tertentu ditempatkan pada perbenihan

padat yang telah ditanami dengan biakan tebal organisme yang diperiksa. Setelah pengeraman, garis tengah daerah hambatan jernih yang mengelilingi obat dianggap sebagai ukuran kekuatan hambatan obat terhadap mikroorganisme yang diperiksa (3).

Ada beberapa faktor yang mempengaruhi difusi antimikroba yaitu (3)

1. Faktor fisik : waktu predifusi, suhu Inkubasi, ketebalan lempeng, nilai pH, viskositas medium dan larutan uji
2. Faktor biologi : populasi mikroorganisme, komposisi medium dan garam-garam logam berat.

II.7 Metode Pemisahan

II.7.1 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan bentuk kromatografi planar selain kromatografi kertas dan elektroforesis (32).

1. Fase Diam

Fase diam yang digunakan dalam KLT merupakan penjerap berukuran kecil dengan diameter partikel antara 10-30 μm . Semakin kecil ukuran rata-rata partikel fase diam dan semakin sempit kisaran ukuran fase diam, maka semakin baik kinerja KLT dalam hal efisiensinya dan resolusinya, mekanisme sorpsi yang utama pada KLT adalah partisi dan adsorpsi (32).

2. Fase Gerak

Sistem yang paling sederhana adalah campuran dua pelarut organik, karena adanya elusi campuran kedua pelarut dapat mudah diatur

sedemikian rupa sehingga pemisahan dapat terjadi secara optimal (32).

3. Deteksi Bercak

Bercak pemisahan KLT umumnya merupakan bercak yang tidak berwarna. Berikut cara-cara untuk mendeteksi bercak (32) :

1. Menyemprot lempeng KLT dengan reagen kromogenik yang akan bereaksi secara kimia dengan seluruh solut yang mengandung gugus-gugus fungsional tertentu sehingga bercak menjadi berwarna.
2. Mengamati lempeng di bawah lampu ultra violet yang dipasang panjang gelombang emisi 254 atau 366 untuk menampakkan solut sebagai bercak yang gelap atau bercak yang berfluoresnsi pada dasar yang berfluoresensi seragam.
3. Menyemprot lempeng dengan asam sulfat pekat atau asam nitrat pekat lalu dipanaskan untuk mengoksidasi solute-solut negatif yang akan nampak sebagai bercak hitam sampai kecoklat-coklatan.
4. Memaparkan lempeng dengan uap iodium dalam chamber tertutup.
5. Melakukan scanning pada permukaan lempeng dengan densitometer.

II.7.2 KLT bioautografi

Bioautografi adalah suatu metode pendeteksian untuk menemukan suatu senyawa antimikroba yang belum teridentifikasi dengan cara melokalisir aktivitas antimikroba tersebut pada suatu kromatogram. Metode ini memanfaatkan pengerjaan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) (32).

Bioautografi dapat dibagi atas tiga kelompok yaitu :

1. Bioautografi Langsung

Bioautografi Langsung yaitu dimana mikroorganismenya tumbuh secara langsung di atas lempeng Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Land dan Lyon menyatakan bahwa bioautografi secara langsung aktivitas antibakterinya sangat sensitif dan melokalisir senyawa-senyawa yang aktif, tetapi juga mempunyai kekurangan seperti keterbatasan mikroorganisme yang dapat tumbuh secara langsung di atas lapisan kromatografi, keterbatasan bakteri uji pada lempeng dan memungkinkan terjadinya kontaminasi sangat besar (32).

2. Bioautografi kontak

Dimana senyawa antimikroba dipindahkan dari lempeng KLT ke medium agar yang telah diinokulasikan bakteri uji yang peka secara merata dan melakukan kontak langsung. Bioautografi kontak merupakan tipe yang paling sering digunakan (32).

3. Bioautografi pencelupan

Dimana medium agar telah diinokulasikan dengan suspensi bakteri dituang di atas lempeng KLT. Merupakan metode yang paling tepat, karena tidak dipengaruhi oleh kemungkinan terjadinya kontaminasi (32).

BAB III

PELAKSANAAN PENELITIAN

III.1 Penyiapan Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian adalah bejana maserasi, cawan petri, gelas erlenmeyer (*Pyrex*[®]), gelas ukur 100 ml (*Pyrex*[®]), inkubator aerob, jangka sorong (*Double acraband*[®]), LAF (*Laminary Air Flow*), enkas, lampu spritus, ose bulat, sentrifugasi, otoklaf (*Memmert*), oven, pipet mikron (*Socorex*[®]), timbangan analitik (*Sartorius*[®]), rotavapor (*Banchlll*), lampu UV panjang gelombang 254 nm dan 366 nm.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah sawo manila (*Manikara zapota* Linn.), medium nutrien agar (NA), medium nutrien broth (NB), air suling, etanol 96%, etil asetat, kloroform, n-heksan, lempeng KLT silika gel GF₂₅₄, kertas cakram, biakan murni bakteri *Escherichia coli* resisten antibiotik, biakan murni bakteri *Staphylococcus aureus* resisten antibiotik.

III.2 Penyiapan dan Pengolahan Sampel

III.2.1 Pengambilan Sampel

Sampel penelitian yaitu sawo manila (*Manikara zapota* Linn.) diambil dari Kabupaten Wajo Provinsi Sulawesi selatan. Sampel yang diambil berupa buah yang masih mentah (belum matang).

III.2.2 Pengolahan Sampel

Buah sawo manila dibersihkan dengan menggunakan air mengalir sebanyak tiga kali, kemudian dirajang, lalu diangin-anginkan hingga kering. Sampel yang telah kering diserbukkan dan ditimbang.

III.2.3 Ekstraksi Sampel

Sampel buah sawo manila yang telah ditimbang dan memiliki berat 1,3 kg dibasahkan terlebih dahulu dengan cairan penyari dan dimasukkan ke dalam wadah lalu direndam dengan cairan etanol 96% selama satu sampai dua hari pada temperatur kamar dan terlindung dari cahaya. Penyarian dibiarkan selama satu sampai dua hari sambil sekali-kali diaduk, kemudian disaring. Ampas yang diperoleh dari hasil penyarian pertama diekstraksi kembali hingga cairan penyari tidak berwarna. Ekstrak etanol cair yang diperoleh kemudian dikumpulkan, diuapkan dengan menggunakan rotavapor, kemudian diangin-anginkan ditempat yang terlindung dari cahaya matahari langsung sampai diperoleh ekstrak etanol kering, lalu ekstrak ditimbang.

III.2.4 Partisi Ekstrak Awal

Ekstrak etanol 96% sebanyak 100 g dipartisi dengan menggunakan metode ekstraksi cair-padat, dimana digunakan tiga macam pelarut yang kepolarannya berbeda yaitu n-heksan, kloroform dan etil asetat. Ekstrak etanol ditimbang sebanyak 2 g, untuk pelarut pertama menggunakan n-heksan kemudian dihomogenkan dengan alat vortex selama beberapa

menit lalu disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama 15 menit, bagian yang larut heksan dipipet dan diuapkan, selanjutnya bagian yang tidak larut n-heksan dicampur dengan kloroform dan homogenkan dengan alat vortex lalu disentrifugasi, bagian yang larut kloroform diuapkan, bagian yang tidak larut kloroform dipartisi lagi dengan menggunakan etil asetat, hal ini dilakukan berulang kali. Sehingga diperoleh ekstrak larut n-heksan, ekstrak larut kloroform, ekstrak larut etil asetat dan ekstrak tidak larut etil asetat. Masing-masing ekstrak yang diperoleh diidentifikasi secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT).

III.2.5 Pembuatan Larutan Ekstrak

Masing-masing ekstrak dibuat dalam konsentrasi 20% b/v, 10% b/v, 5% b/v, dan 2,5% b/v. Dibuat konsentrasi 20% dengan menimbang masing-masing ekstrak sebanyak 500 mg, kemudian dilarutkan dengan pelarut organik yang sesuai secukupnya hingga homogen, dicukupkan volumenya hingga 5 ml.

Hal yang sama dilakukan juga untuk konsentrasi 10% b/v, 5% b/v dan 2,5% b/v dengan menimbang masing-masing ekstrak sebanyak 250 mg, 125 mg, dan 62,5 mg.

III.3 Sterilisasi Alat

Alat-alat yang diperlukan dicuci dengan menggunakan detergen. Digunakan wadah dengan mulut lebar untuk membersihkan alat, pertama

alat direndam dengan detergen panas selama 15 menit, kemudian dibilas dengan menggunakan air bersih lalu dibilas lagi dengan air suling. Alat-alat dikeringkan dengan posisi terbalik diudara terbuka, setelah kering kemudian dibungkus dengan kertas perkamen. Tabung reaksi dan labu Erlenmeyer terlebih dahulu disumbat dengan kapas bersih, alat-alat gelas disterilkan di oven pada suhu 180⁰C selama 2 jam, alat suntik dan alat-alat plastik (tidak tahan pemanasan tinggi) disterikan dengan menggunakan otoklaf selama 15 menit pada suhu 121⁰C dengan tekanan 2 atm.

III.4 Pembuatan Medium

III.4.1 Medium Nutrien Agar (NA)

Komposisi medium NA yaitu pepton 5 gram, ekstrak beef 3 gram, agar 12 gram, dan air suling. Untuk membuat medium NA, diambil pepton, ekstrak beef, dan agar, semua bahan tersebut dilarutkan dalam air suling ad 1000 ml. Kemudian dipanaskan selama 15 menit, pH diatur 7,0, lalu disterilkan dalam otoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.

III.4.2 Medium Nutrien Broth (NB)

Komposisi medium NB yaitu pepton 0,5 gram, ekstrak beef 0,3 gram, dan air suling. Untuk membuat medium NB, diambil pepton dan ekstrak beef, semua bahan tersebut dilarutkan dalam air suling ad 100 ml. Kemudian dipanaskan selama 15 menit, pH diatur 7,0, lalu disterilkan dalam otoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.

III.5 Peremajaan Bakteri Uji

Bakteri uji diremajakan dalam medium NB, diambil bakteri sebanyak 1 ose dan diinokulasikan dalam medium NB, kemudian diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 1x24 jam.

III.6 Pengujian Daya Hambat

Media NA cair yang telah disterilkan dimasukkan ke dalam cawan petri sebanyak 15 ml, didiamkan hingga memadat. Biakan bakteri dalam medium NB diambil dan digoreskan pada media NA yang telah memadat. Masing-masing sampel dengan konsentrasi 20% b/v, 10% b/v, 5% b/v, dan 2,5% b/v serta kontrol pelarut dipipet sebanyak 10 µl dan diteteskan di atas kertas cakram steril lalu didiamkan hingga kering. Kertas cakram yang berisi ekstrak diletakkan di atas medium yang berisi bakteri uji. Diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 1x24 jam. Aktivitas antibakteri ditunjukkan dengan adanya daerah bening disekitar paper disk, zona bening diukur dengan menggunakan jangka sorong. Kemudian dicatat hasilnya.

III.7 Prosedur Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Lempeng KLT diaktifkan dengan pemanasan dalam oven pada suhu 110⁰C selama 30 menit sebelum digunakan. Ekstrak larut kloroform dan larut etil asetat ditotolkan pada lempeng KLT ukuran 1 x 7 cm menggunakan pipa kapiler. Ekstrak yang ditotolkan pada lempeng KLT

dikeringkan dengan hairdryer lalu dimasukkan ke dalam bejana KLT yang telah jenuh dengan eluen Heksan : Etil asetat (1 : 4). Lempeng dikeluarkan dari bejana dan diangin-anginkan hingga cairan penyaringnya menguap. Noda kromatogram pada lempeng diamati di bawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm, noda diperjelas dengan menyemprotkan H_2SO_4 pada lempeng KLT, dan dihitung nilai Rf nodanya.

III.8 Pengujian KLT Bioautografi

Suspensi bakteri dimasukkan dalam cawan petri diikuti dengan dengan medium NA cair. Lempeng KLT yang telah dielusi diletakkan di atas permukaan medium yang telah berisi biakan bakteri kemudian disimpan dalam lemari pendingin selama 1 jam. Lempeng KLT diangkat dari permukaan agar lalu diinkubasi pada suhu $37^{\circ}C$ selama 24 jam. Diamati zona hambat pertumbuhan bakteri yang ditandai dengan adanya daerah bening pada posisi noda dan dibandingkan dengan kromatogram hasil KLT.

III.9 Identifikasi

Ekstrak yang telah dielusi dengan dengan eluan Heksan : Etil asetat (1 : 4) kemudian dilakukan identifikasi dengan cara menyemprot reagen semprot $FeCl_3$, $AlCl_3$, Dragendorf, dan Liberman Burchard (LB).

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

IV.1 Hasil Penelitian

Penelitian telah dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin Makassar pada bulan Januari–April 2013, yaitu menguji aktivitas antibakteri dari ekstrak yang terpurifikasi buah sawo manila (*Manikara zapota* Linn.) terhadap bakteri patogen yang telah resisten terhadap antibiotik.

Tahapan dari penelitian ini diawali dengan ekstraksi sampel dan diperoleh ekstrak etanol kental 117,96 g dan persen rendamen ekstrak sebesar 9% b/b. Kemudian sebanyak 100 g ekstrak dipartisi menggunakan metode ekstraksi cair padat, sehingga diperoleh ekstrak larut n-heksan 1 g, ekstrak larut kloroform 1 g, ekstrak larut etil asetat 1,68 g dan ekstrak tidak larut etil asetat 78,9 g. Masing-masing ekstrak kemudian dilakukan uji daya hambat terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* resisten antibiotik. Dari hasil penelitian selama 1 x 24 jam beberapa ekstrak menunjukkan adanya zona hambat disekitar kertas cakram, besarnya zona hambat yang terbentuk dapat dilihat pada tabel 1 dan tabel 2

Tahap selanjutnya uji KLT bioautografi Ekstrak larut etil asetat terhadap bakteri *Escherichia coli* resisten antibiotik dan ekstrak larut kloroform terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* resisten antibiotik. Dan dilanjutkan dengan analisis senyawa yang terkandung di dalam ekstrak

dengan metode KLT, hasil analisis senyawa dapat dilihat pada tabel 3 dan

4.

Tabel 1 Hasil pengukuran diameter zona hambatan (mm) ekstrak sawo manila (*Manikara zapota* Linn.) terhadap *Escherichia coli* resisten antibiotik.

Ekstrak	Diameter zona hambatan (mm)			
	2,5%	5%	10%	20%
Etanol	0,00	0,00	0,00	6,35
	0,00	0,00	0,00	6,10
	0,00	0,00	0,00	7,05
Rata-rata	0,00	0,00	0,00	6,50
Kontrol	0,00	0,00	0,00	0,00
Larut Heksan	0,00	0,00	0,00	7,05
	0,00	0,00	0,00	6,15
	0,00	0,00	0,00	6,30
Rata-rata	0,00	0,00	0,00	6,50
Kontrol	0,00	0,00	0,00	0,00
Larut Kloroform	0,00	7,35	9,30	12,25
	0,00	7,05	9,05	12,35
	0,00	6,35	9,15	12,15
Rata-rata	0,00	6,91	9,16	12,25
Kontrol	0,00	0,00	0,00	0,00
Larut Etil asetat	0,00	8,15	13,10	16,05
	0,00	8,10	12,10	16,15
	0,00	7,20	11,35	15,40
Rata-rata	0,00	7,81	12,10	15,96
Kontrol	0,00	0,00	0,00	0,00
Tidak larut etil asetat	0,00	0,00	0,00	7,05
	0,00	0,00	0,00	8,10
	0,00	0,00	0,00	7,35
Rata-rata	0,00	0,00	0,00	7,50
Kontrol	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabel 2 Hasil pengukuran diameter zona hambatan (mm) ekstrak sawo manila (*Manikara zapota* Linn.) terhadap *Staphylococcus aureus* resisten antibiotik

Ekstrak	Diameter zona hambatan (mm)			
	2,5%	5%	10%	20%
Etanol	0,00	0,00	0,00	9,25
	0,00	0,00	0,00	9,35
	0,00	0,00	0,00	9,25
Rata-rata	0,00	0,00	0,00	9,28
Kontrol	0,00	0,00	0,00	0,00
Larut Heksan	0,00	0,00	0,00	7,45
	0,00	0,00	0,00	7,10
	0,00	0,00	0,00	7,15
Rata-rata	0,00	0,00	0,00	7,23
Kontrol	0,00	0,00	0,00	0,00

Ekstrak	Diameter zona hambat (mm)			
	2,5%	5%	10%	20%
Larut Kloroform	8,00	11,10	13,40	14,40
	8,00	11,25	14,05	15,20
	8,01	11,21	13,60	14,88
Rata-rata	0,00	0,00	0,00	0,00
Kontrol	0,00	8,25	11,45	14,25
Larut Etil asetat	0,00	8,25	11,45	14,25
	0,00	7,15	12,20	14,10
	0,00	7,05	12,30	13,30
Rata-rata	0,00	7,48	12,00	13,80
Kontrol	0,00	0,00	0,00	0,00
Tidak larut etil asetat	6,10	8,20	10,05	10,50
	6,15	8,05	9,40	11,45
	6,20	7,30	9,15	10,40
Rata-rata	6,15	7,85	9,53	10,71
Kontrol	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabel 3. Profil KLT bioautografi dan identifikasi ekstrak larut Kloroform buah sawo manila (*Manikara zapota* Linn.).

No spot	Nilai Rf	KLT-Bioautografi	Warna noda di UV 254nm	Warna noda di UV 366nm	Warna noda di H ₂ SO ₄	Warna noda di Liberman Buchard	Dugaan Senyawa
1.	0,84	+	Hitam	-	coklat	Ungu	Terpen
2.	0,75	-	-	-	Ungu	Ungu	
3.	0,67	-	-	-	Hitam	-	
4.	0,51	-	Hitam	-	Ungu terang	Ungu terang	Terpen
5.	0,32	-	-	-	Hitam	Hitam	-
6.	0,20	-	-	-	-	Hitam	-

Tabel 4. Profil KLT bioautografi dan identifikasi ekstrak larut etil asetat buah sawo manila (*Manikara zapota* Linn.).

No Spot	Nilai Rf	KLT-bioautografi	Warna noda di UV 254	Warna noda di UV 366	Warna noda di H ₂ SO ₄	Warna noda di Liberman Buchard	Warna noda di FeCl ₃	Dugaan Senyawa
1.	0,65	+	-	-		Ungu	-	Terpen
2.	0,50	+	-	Ungu	Hitam	Hitam	Biru tua	Flavonoid
3.	0,34	-	-	-	Hitam	Hitam	-	-
4.	0,25	-	Hitam	Ungu	-	Ungu muda	Hijau tua	Tannin

Keterangan :

(+) : Terdapat Noda

(-) : Tidak terdapat Noda

IV.2 Pembahasan

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sawo manila (*Manikara zapota* Linn.), bagian yang digunakan adalah buahnya yang masih mentah, digunakan buah mentah karena penggunaannya dimasyarakat sebagai obat diare dan demam tifoid.

Pada tahap awal buah sawo manila (*Manikara zapota* Linn.) yang telah dikumpulkan dibersihkan dan dicuci dengan air untuk menghilangkan kotoran-kotoran yang melekat. Setelah dipisahkan bagian yang tidak diperlukan, buah sawo manila dikecilkan ukurannya dan diangin-anginkan hingga kering di tempat yang tidak terpapar langsung sinar matahari. Selanjutnya buah yang telah kering diserbukkan. Maksud penyerbukkan sampel adalah untuk memperluas permukaan bidang sentuhan antara cairan penyari dan sampel, dengan demikian penyarian dapat lebih efektif.

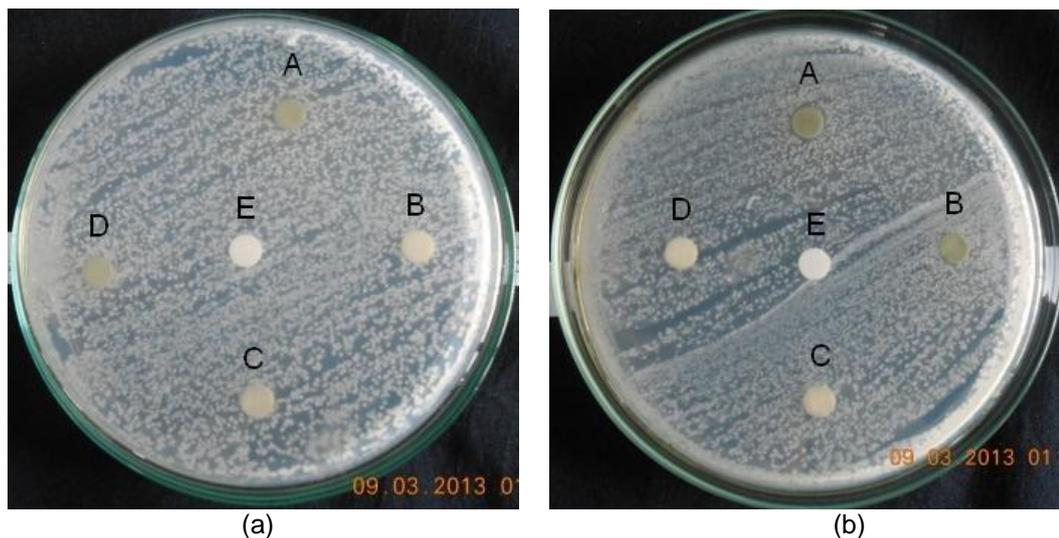
Sampel dalam bentuk serbuk diekstraksi dengan menggunakan metode meserasi, yang merupakan proses penyarian secara dingin dan paling sederhana diantara metode lain, yaitu dengan cara merendam sampel dalam cairan penyari etanol 96%. Pada saat perendaman sampel dalam etanol, konsentrasi di luar sel lebih tinggi dari pada di dalam sel sehingga isi sel termasuk zat aktifnya akan keluar dan terlarut dalam etanol (20). Proses penyarian dilakukan berulang-ulang dengan mengganti cairan penyari yang baru pada sampel yang sama hingga penyarian sempurna (cairan pelarut tampak tidak berwarna). Kepolaran dari etanol yaitu 0,68 yang menunjukkan bahwa etanol merupakan pelarut

yang bersifat polar, pelarut yang bersifat polar dapat menyari senyawa yang bersifat polar maupun nonpolar.

Setelah diperoleh ekstrak cair kemudian diuapkan cairan penyaringnya dengan menggunakan rotavapor sehingga diperoleh ekstrak kental etanol dan kemudian dipartisi dengan menggunakan metode ekstraksi cair-padat. Prinsip partisi pada umumnya menggunakan satu macam pelarut dengan tingkat kepolaran yang lebih rendah dari pelarut yang dipartisi (33). Pada penelitian ini untuk tahap partisi digunakan tiga macam pelarut yaitu n-heksan, kloroform, dan etil asetat. Partisi ini bertujuan untuk memisahkan senyawa berdasarkan kepolarannya sehingga ekstrak yang diperoleh lebih sederhana dibandingkan dengan ekstrak awal. Ekstrak yang diperoleh yaitu ekstrak larut n-heksan, ekstrak larut kloroform, ekstrak larut etil asetat, ekstrak tidak larut etil asetat, dan ekstrak etanol dilakukan identifikasi, secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Lima ekstrak yang diperoleh dilakukan uji aktivitas antibakteri dengan menggunakan metode difusi agar pada bakteri gram positif *Staphylococcus aureus* dan bakteri gram negatif *Escherichia coli* yang resisten terhadap antibiotik. Konsentrasi yang digunakan pada masing-masing ekstrak yaitu 2,5% b/v, 5% b/v, 10% b/v, dan 20% b/v. Menurut Abu Osman dkk (2011) ekstrak etil asetat daun dan batang sawo manila dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* pada konsentrasi 3% b/v dengan besar zona hambat 10 mm.

Berdasarkan hasil pengukuran zona hambat diperoleh ekstrak etanol dan ekstrak larut n-heksan dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* pada konsentrasi 20% b/v, sedangkan pada konsentrasi 2,5% b/v, 5% b/v, dan 10% b/v tidak terdapat zona hambat. (Gambar 2 dan Gambar 3).



Gambar 2 : Hasil uji daya hambat ekstrak etanol buah sawo manila (*Manikara zapota* Linn.)

Keterangan :

A : Konsentrasi ekstrak 20% b/v

B : Konsentrasi ekstrak 10% b/v

C : Konsentrasi ekstrak 5% b/v

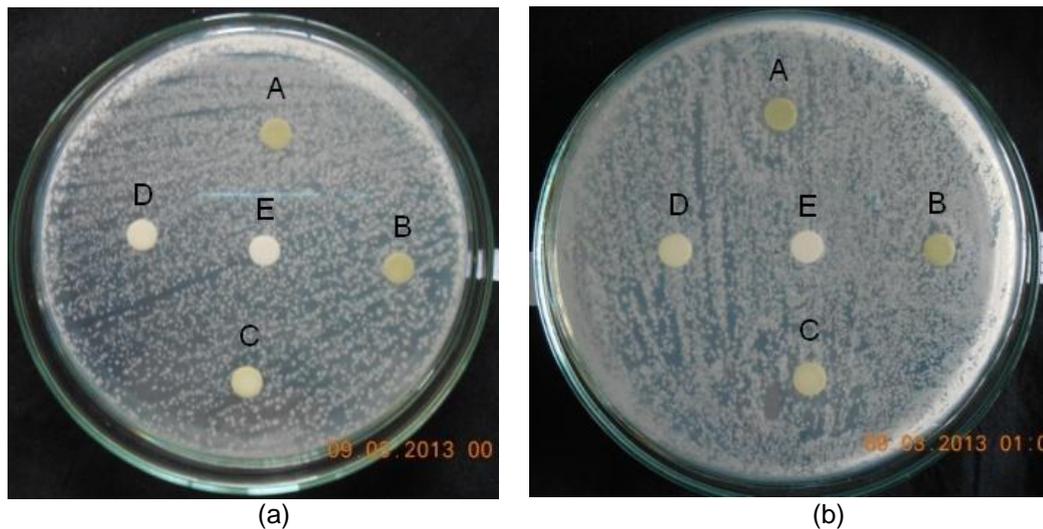
D : Konsentrasi ekstrak 2,5% b/v

E : Kontrol pelarut

(a) : *Escherichia coli* resisten antibiotik

(b) : *Staphylococcus aureus* resisten antibiotik

Daya hambat dari ekstrak etanol sangat kecil yaitu 9,28 mm untuk *Staphylococcus aureus* dan 6,50 mm pada konsentrasi 20% untuk *Escherichia coli*, hal ini dikarenakan senyawa dalam ekstrak etanol masih sangat kompleks/ banyak.



Gambar 3 : Hasil uji daya hambat ekstrak larut heksan buah sawo manila (*Manikara zapota* Linn.)

Keterangan :

(a) : *Escherichia coli* resisten antibiotik

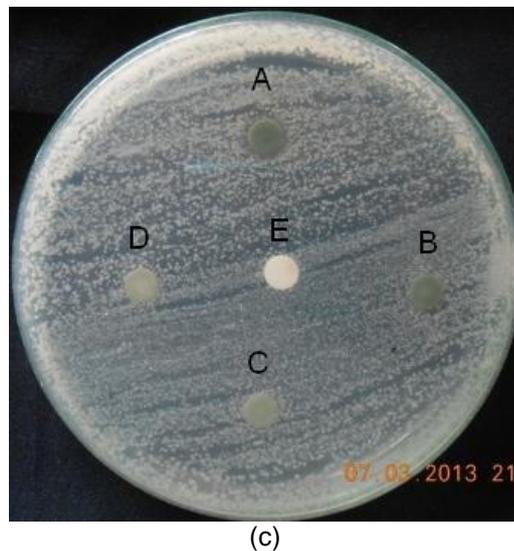
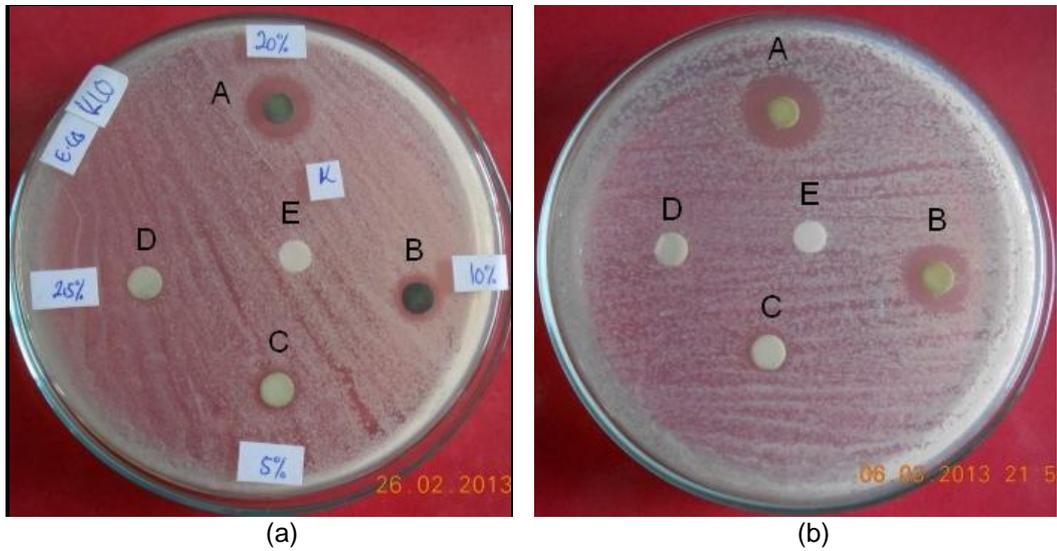
(b) : *Staphylococcus aureus* resisten antibiotik

Daya hambat dari ekstrak larut n-heksan setelah dilakukan partisi juga sangat kecil, hal ini mungkin dikarenakan senyawa aktif antibakteri memiliki kelarutannya yang rendah dalam pelarut n-heksan.

Ekstrak larut etil asetat memiliki zona hambat yang besar pada bakteri *Escherichia coli* dengan zona hambat pada konsentrasi 20% b/v 15,96 mm dibandingkan ekstrak larut kloroform dengan diameter 12,25 mm, sedangkan ekstrak tidak larut etil asetat memiliki daya hambat yang kecil, yaitu hanya dapat menghambat pada konsentrasi 20% b/v dengan diameter 7,5 mm, dapat dilihat pada gambar 4.

Penghambatan senyawa antibakteri adalah kemampuan senyawa antibakteri tersebut untuk mempengaruhi dinding sel mikroba. Bakteri gram negatif memiliki struktur dinding sel mikroba yang lebih rumit dibandingkan bakteri gram positif, bakteri gram negatif mengandung tiga

polimer yang terletak di luar lapisan peptidoglikan: lipoprotein, porin matriks dan lipopolisakarida (LPS). Dalam upaya untuk mencapai sasaran,



Gambar 4 : Uji daya hambat ekstrak buah sawo manila (*Manikara zapota* Linn.) terhadap *Escherichia coli* resisten antibiotik.

Keterangan :

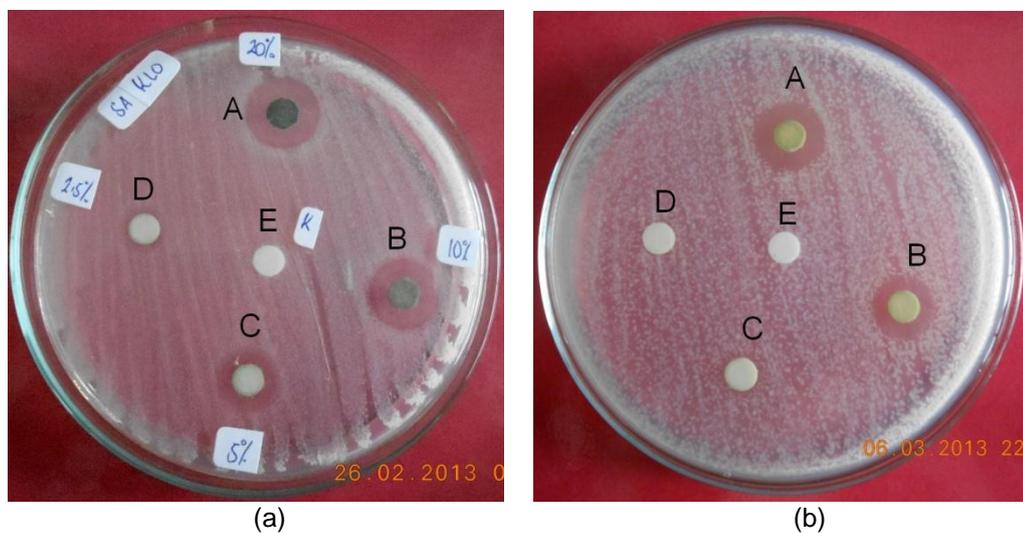
- (a) : Kloroform
- (b) : Etil asetat
- (c) : Tidak larut etil asetat

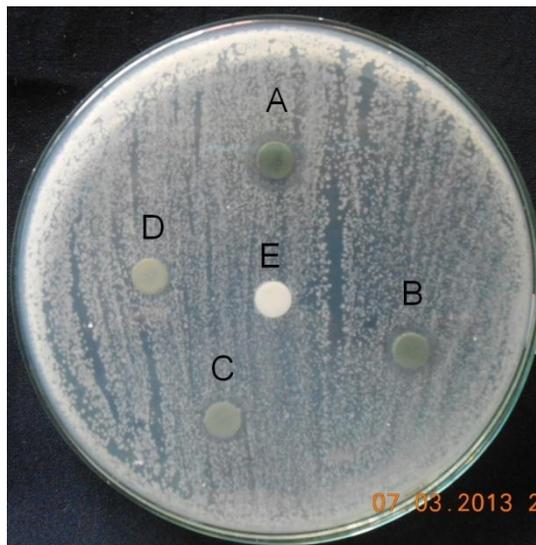
Senyawa antibakteri dapat menembus LPS dari dinding sel tersebut, molekul-molekul yang bersifat hidrofilik mudah melewati LPS dibandingkan dengan yang hidrofobik. Pada bakteri gram negatif terdapat

sisi hidrofilik yaitu karboksil, asam amino, dan hidroksil (34). Karena sifat dari bakteri gram negatif polar maka akan lebih mudah di lewati oleh ekstrak etil asetat yang bersifat lebih polar dibandingkan ekstrak kloroform.

Ekstrak yang memiliki zona hambat besar pada bakteri gram positif *Staphylococcus aureus* adalah ekstrak larut kloroform yang dapat menghambat sampai pada konsentrasi 2,5% b/v, ekstrak larut etil asetat dan tidak larut etil asetat juga memiliki zona hambat pada *Staphylococcus aureus*. Ekstrak larut kloroform lebih aktif pada bakteri gram positif dibandingkan bakteri gram negatif. (Gambar 4).

Untuk dapat membunuh mikroorganisme, bahan uji harus masuk ke dalam sel melalui dinding sel. Kepekaan bakteri gram positif disebabkan tidak terdapatnya molekul reseptor spesifik untuk penetrasi antimikroba dan susunan matriksnya terbuka, sehingga bahan dari luar dapat dengan mudah masuk dan merusak dinding sel (34).





(c)

Gambar 5 : Uji daya hambat ekstrak buah sawo manila (*Manikara zapota* Linn.) terhadap *Staphylococcus aureus* resisten antibiotik

Keterangan :

(a) : Kloroform

(b) : Etil asetat

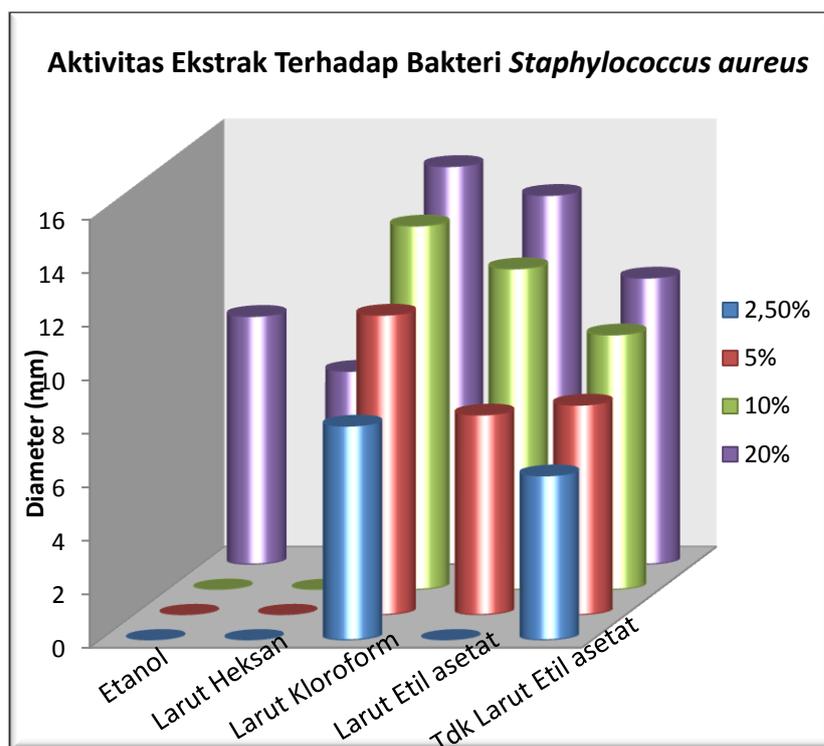
(c) : Tidak larut etil asetat

Pada ekstrak tidak larut etil asetat zona hambat yang terbentuk tidak berwarna bening. (Gambar 5). Adanya aktivitas antibakteri atau antijamur ditandai dengan terbentuknya zona hambatan yang bersifat radikal atau iradikal. Zona radikal tampak berupa daerah yang jernih tanpa terlihat pertumbuhan mikroba uji sedangkan zona iradikal masih ada pertumbuhan mikroba tetapi dihambat atau pertumbuhan itu lebih kecil dibanding pertumbuhan yang tidak dihambat, oleh karena itu zona iradikal berupa zona yang keruh tetapi masih lebih jernih dibandingkan pertumbuhan disekitarnya (33).

Selanjutnya dilakukan uji KLT bioautografi pada ekstrak yang memiliki zona hambat paling besar. KLT bioatugrafi merupakan salah

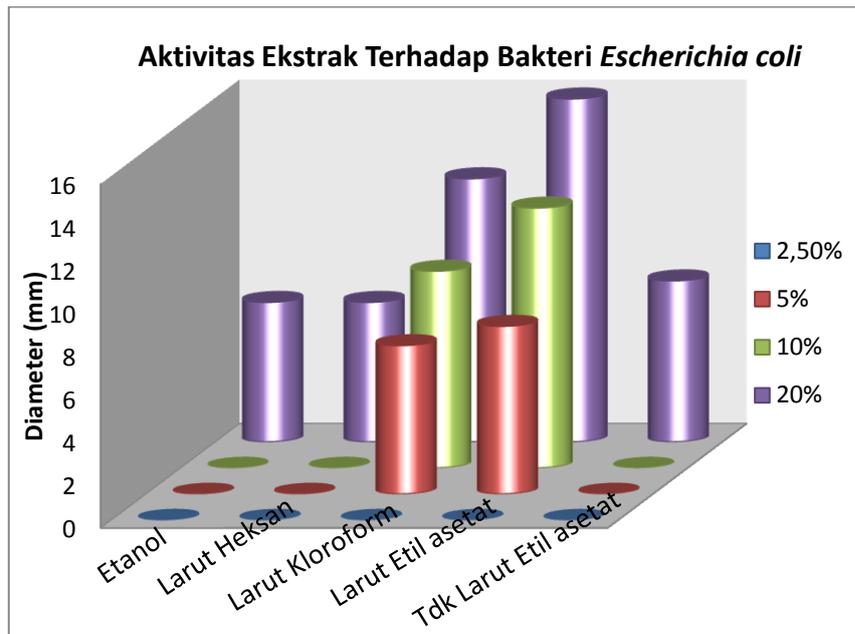
satu metode untuk mengidentifikasi suatu senyawa antimikroba dengan cara melokalisir senyawa tersebut pada suatu kromatogram (31).

Berdasarkan grafik yang ditunjukkan pada gambar 6, ekstrak larut kloroform memiliki zona hambat paling besar terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Sehingga dilakukan uji KLT bioautografi ekstrak Larut kloroform terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.



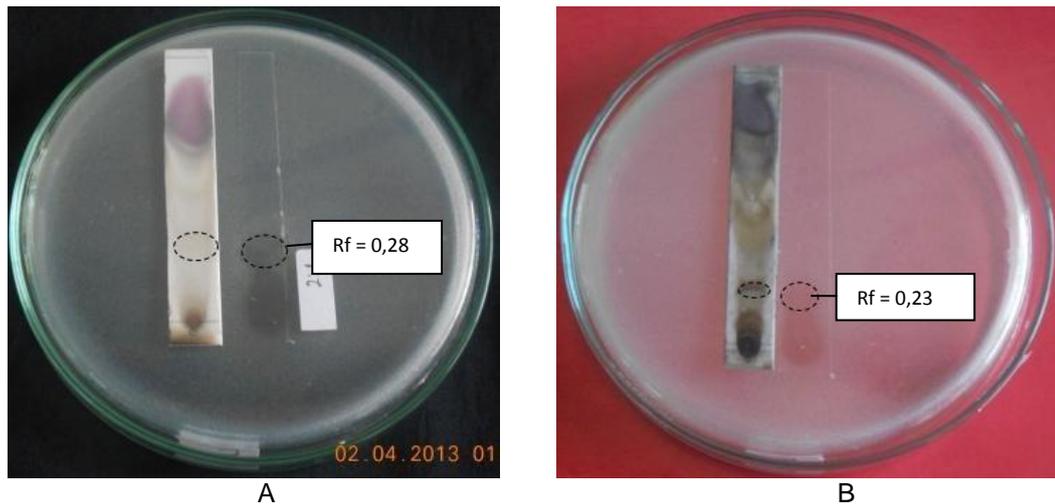
Gambar 6 : Histogram zona hambat rata-rata (mm) ekstrak terpurifikasi buah sawo manila (*Manikara zapota* Linn.) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* resisten antibiotik.

Sedangkan pada grafik yang ditunjukkan pada gambar 7 ekstrak larut etil asetat memiliki zona hambat paling besar pada bakteri *Escherichia coli* sehingga dilakukan pula KLT bioautografi.



Gambar 7 : Histogram zona hambat rata-rata (mm) ekstrak terpurifikasi buah sawo manila (*Manikara zapota* Linn.) terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* resisten antibiotik

. Pada metode ini pertama-tama dilakukan KLT pada kedua ekstrak dan dielusi dengan menggunakan eluen heksan : etil asetat 2 : 1 dan hasilnya dapat dilihat pada Gambar 8. Terdapat zona hambat yang letaknya sangat berdekatan dengan tempat penotolan sampel sehingga dilakukan KLT ulang karena akan sulit nantinya dilakukan identifikasi senyawa, dimana eluen yang digunakan bersifat nonpolar sehingga memungkinkan banyak senyawa yang bersifat polar tidak terpisah dengan sempurna dan berada disekitar tempat penotolan sehingga sulit melakukan identifikasi.



Gambar 8 : Uji KLT bioautografi ekstrak Buah Sawo manila (*Manikara zapota* Linn.)

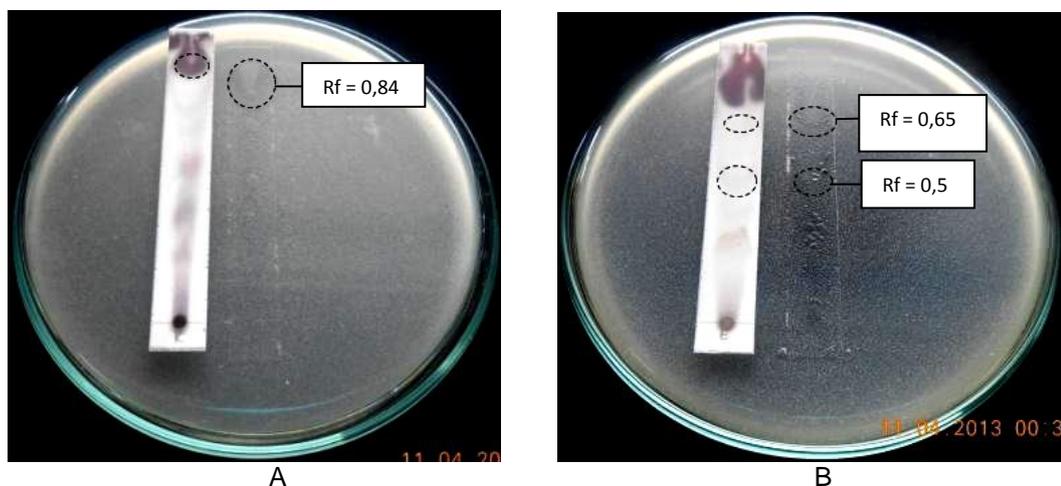
Keterangan :

A : Ekstrak Kloroform terhadap *Staphylococcus aureus* resisten antibiotik

B : Ekstrak Etil asetat terhadap *Escherichia coli* resisten antibiotik

Fase gerak : (Heksan : Etil asetat) (2:1)

Selanjutnya dilakukan KLT bioautografi dengan eluen heksan : etil asetat (1 : 4) dan terdapat dua zona hambat pada ekstrak larut etil asetat dan satu zona hambat pada ekstrak larut kloroform. Hasilnya dapat dilihat pada gambar 9.



Gambar 9 : Uji KLT bioautografi ekstrak Buah Sawo manila (*Manikara zapota* Linn.)

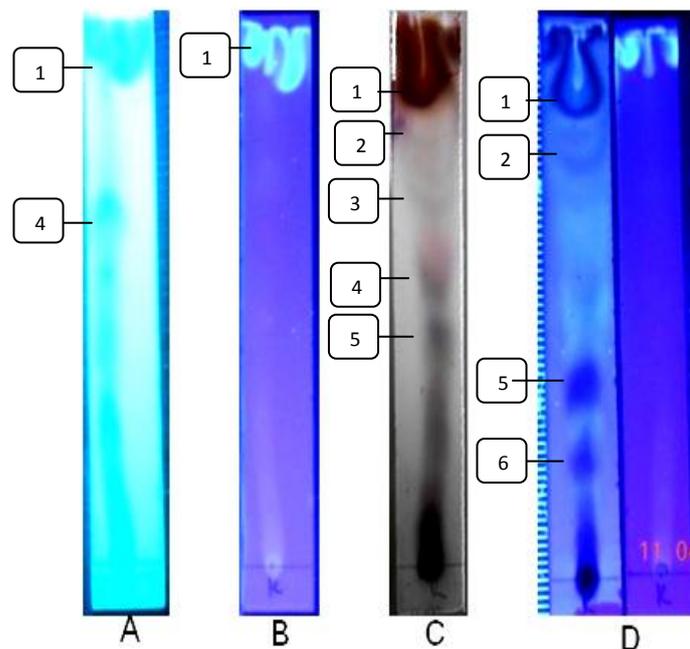
Keterangan :

A : Ekstrak Kloroform terhadap *Staphylococcus aureus* resisten antibiotik

B : Ekstrak Etil asetat terhadap *Escherichia coli* resisten antibiotik

Fase gerak : (Heksan : Etil asetat) (1:4)

Untuk mengetahui senyawa antibakteri dalam ekstrak larut kloroform dan larut etil asetat maka dilakukan identifikasi. Lempeng KLT diamati di bawah lampu UV 254nm dan 366nm, semprot H₂SO₄, semprot reagen FeCl₃ dan Liberman bouchardat (LB). (Gambar 10)



Gambar 10 : Hasil Identifikasi senyawa dalam ekstrak larut kloroform.buah sawo manila (*Manikara zapota* Linn.)

Keterangan :

A : Lampu UV 254 nm

B : Lampu UV 366 nm

C : semprot H₂SO₄

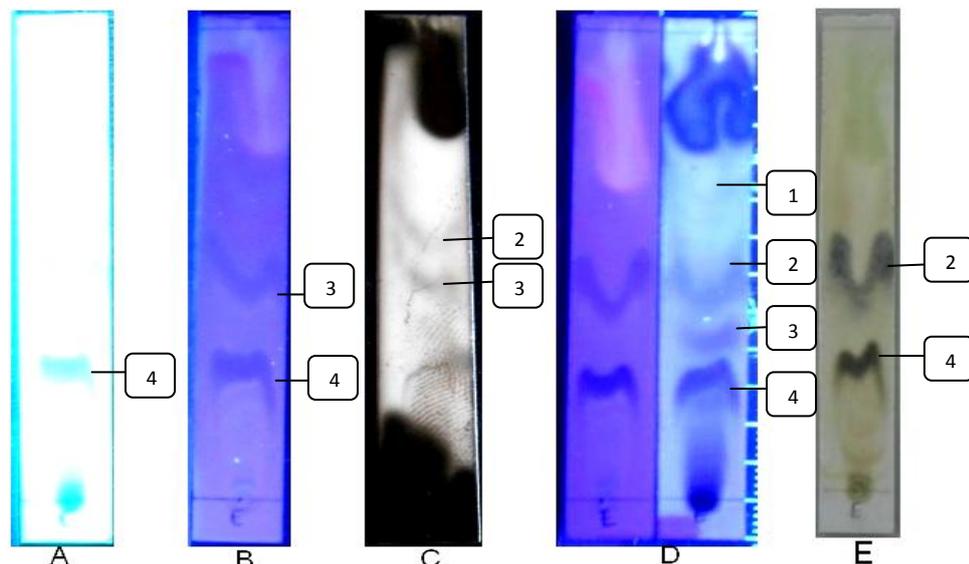
D : Semprot reagen LB dibawah lampu UV 366nm

Fase gerak : (Heksan : Etil asetat) (1 : 4)

Pada ekstrak larut kloroform diduga terdapat senyawa terpenoid karena ketika lempeng disemprot dengan FeCl₃ muncul spot noda 1 yang berwarna ungu dan letaknya sejajar dengan zona hambat yang terbentuk, dimana spot tersebut nampak pada UV 254nm dan 366nm juga nampak pada profil H₂SO₄. Senyawa terpenoid berpotensi sebagai agen

antimikroba. Senyawa triterpenoid yang mempunyai aktivitas antimikroba antara lain adalah borneol, sineol, pinen, kamfer. Senyawa terpenoid efektif untuk menghambat pertumbuhan *B.subtilis*, *S.aureus*, dan *E.coli*.

(36)



Gambar 11 : Hasil identifikasi senyawa dalam ekstrak larut etil asetat .buah sawo manila (*Manikara zapota* Linn.)

Keterangan :

A : Lampu UV 254 nm

B : Lampu UV 366 nm

C : semprot H_2SO_4

D : Semprot reagen LB dibawah lampu UV 366nm

F : Semprot reagen $FeCl_3$

Fese gerak : (Heksan : Etil asetat) (1 : 4)

Pada gambar 10 yaitu identifikasi senyawa ekstrak larut etil asetat, dimana pada KLT bioautografinya terdapat dua zona hambat, berdasarkan uji identifikasi diperoleh bahwa pada noda 1 diduga golongan senyawa terpenoid dan noda 2 senyawa fenolik yaitu flavonoid, karena ketika disemprot dengan reagen $FeCl_3$ terjadi perubahan warna menjadi biru kehitaman pada noda 2 yang sejajar dengan zona hambat kedua pada KLT bioautografi, dimana keduanya memiliki nilai Rf 0,5. Dan pada

spot noda 1 muncul ketika disemprot dengan reagen LB dan sejajar dengan zona hambat pertama dan keduanya memiliki nilai Rf yang sama yaitu 0,65. Dari hasil identifikasi terdapat pula senyawa tannin pada noda 4 akan tetapi tidak terdapat zona hambat yang sejajar dengan noda tersebut padahal menurut teori tannin mempunyai potensi sebagai antimikroba (34). Menurut sumitral dan mital (2010) daun sawo manila mengandung senyawa terpenoid, flavonoid, tannin, polifenol dan glikosida.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

V.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa :

1. Ekstrak kloroform dan ekstrak etil asetat aktif terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* resisten antibiotik.

Ekstrak kloroform terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* memiliki diameter hambat 14,88 mm dan ekstrak etil asetat terhadap *Escherichia coli* memiliki diameter hambat 15,96 mm pada konsentrasi 20% b/v.

2. Hasil KLT bioautografi diduga bahwa senyawa yang aktif adalah golongan fenolik dengan Rf 0,50 dan golongan terpen dengan Rf 0,65 pada ekstrak etil asetat, dan golongan terpen dengan Rf 0,75 pada ekstrak kloroform.

V.2 Saran

Perlu dilakukan isolasi dan identifikasi senyawa yang berpotensi sebagai antibakteri dari sawo manila (*Manikara zapota* Linn.).

DAFTAR PUSTAKA

1. Robins, Kotran, dan Kumar. 1999. *Buku Saku Dasar Patologi Penyakit*. ed 5. EGC. Jakarta. Hal 189
2. Nuswantari D . 1998. *Kamus Saku Kedokteran Dorland*. ed 25. EGC. Jakarta. Hal 555
3. Jawetz, Melnik dan Adelbergs. 2010. *Medical Microbiology*. Ed. 25. McGraw-Hill Companies. New York. Hal 145
4. Entjang I. 2003. *Mikrobiologi dan Parasitologi*. PT Citra Aditya Bakti. Bandung. Hal 52, 103,118, 131.
5. Kesehatan Republik Indonesia. 2011. *Pedoman Umum Tentang Penggunaan Antibiotik*. Jakarta. Hal 1. Available as PDF file
6. Syahrurachman A, Chatim A, Karuniawati A, Triyatni M, Asmono N, Suntoso, Bela B, Sardjito R dan Suharto . 1994. *Buku Ajar Mikrobiologi Kedokteran*. Bina Pura Aksara. Jakarta. Hal 47,60
7. Gillespie S dan Bamford K. 2009. *At a Glance Mikrobiologi Medis dan Infeksi* .ed 3. Erlangga. Jakarta. Hal 18,19
8. Farida H, Herawari, Haspari MM, otoatmojo H, Hardian. 2008. *Penggunaan Antibiotik Secara Bijak Untuk Mengurangi Resistensi Antibiotik, Studi Intervensi di Bagian Kesehatan Anak RS Dr. Kariadi. Sari Pediatri*. Semarang. [Dikutip 20 November 2012]. Vol 10 No 1 Available from: <http://www.idai.or.id/saripediatri/pdf/10-1-6.pdf>
9. Djide MN dan Sartini. 2008. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin. Makassar. Hal 332
10. Refdanita, Maksum, Nurgani, dan Endang. 2004. *Pola Kepekaan Di Ruang Gawat Intensif Rumah Sakit Fatmawati Jakarta Tahun 2001 – 2002. Makala, Kesehatan*, Jakarta. [Dikutip 20 september 2012]. vol. 8, No. 2. Available from: http://lrsitbrd.nic.in/IJTB/Year_202010/IJT/20APRIL2010.pdf.
11. Chanda dan Nagani. 2010. *Antioxidant Capacity Of Manikara Zapota L. Leaves Extracts Evaluated by Four in vitro Methods*. Nature and

Science. India. [Dikutip 20 september 2012] . Available from:<http://www.Sciencepub.net/natur>.

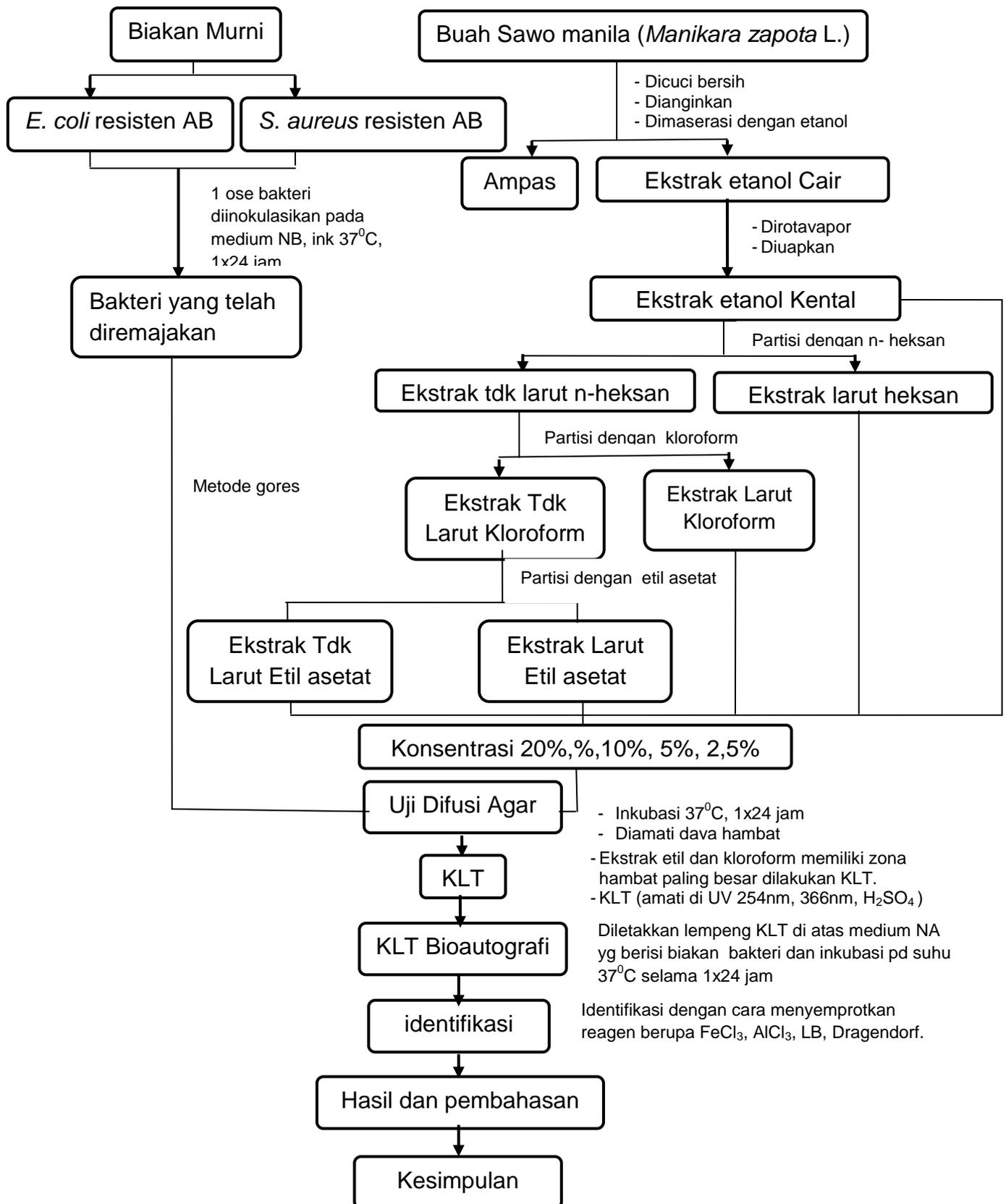
12. Satish, Raghavendra dan Rawesha. 2008. *Avaluation of the Antibacterial Potential of Some Plants Against Human Pathogenic Bacteria.* IDOSI Publication. India. [Dikutip 20 september 2012]. Vol 2 Available from: http://www.ijat-aatsea.com/pdf/JUN_V2_07/9-IJAT2007_12-R.pdf
13. Osman, Habib, dan Karim. 2011. *Antimicrobial Investigation on Manikara zapota L. P Royen.* *international jurnal of Drug Development and Research.* Bangladesh. [Dikutip 20 september 2012]. Vol 3 Available from:<http://www.ijddr.in> covered in official product.
14. Sumitra, dan Mital. 2010. *Indian Nutraceutical Plant Leaves as a Petential Source Of Natural Antimikrobia Agents.* [Dikutip 20 september 2012]. Available from: <http://www.formatexinfo/microbiology3/book/1251-1259.pdf>
15. Jamuna K, Ramesh C, Srinivasa T dan Raghu K. 2011. *Invitro Antioxidanta Studies in Some Common Fruits.* *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* [Dikutip 04 Desember 2012]. Vol 3 no 1. Available from: <http://www.ijpps.com/Vol3Issue1/2098.pdf>
16. Tjitrosoepomo G. 2005. *Taksonomi Tumbuhan Obat-Obatan.* Yogyakarta : UGM Press. Hal : 313-316
17. Van den brink B. 1965. *Flora Of Java (Spermatophytes Only) Vol II.* Netherlands. Nourdholf-Groninjen. Hal : 191..
18. Triono, Teguh. *Sawo-sawoan Suatu Potensi yang Terkesampikan.* Balitbang Botani, Puslitbang Biologi LIPI Bogor. Bogor. 2000. Hal 98
19. Ditjen POM. *Farmakope Indonesia* ed 4. Jakarta :Depkes RI. 1995. Hal 10
20. Depkes RI. *Sediaan Galenik.* Jakarta : Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. 1989. Hal 8, 10
21. Djide MN dan sartini. *Dasar-Dasar Mikrobiologi Makassar :* Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin. 2008. Hal 328.
22. Davidson PM dan Brannen AL. 1993. *Antimicrobials in Foods* Edisi 2. New York : Mackel Dekker inc.

23. Gemmel CG dan Lorian V. 1996. *Effect of Low Concentration of Antibiotics on Bacterial ultrastructure, Virulance, and Suscebtability to Immunedefence Clinical Sinifikance*. London : Academic Press
24. Nychas GJE dan Tassou CC. 2000. *Encyclopedia of Food Microbiology*. Volume I. London : Academic Press.
25. Gunawan dan Sulistia G. 2007. *Farmakologi dan Terapi* ed 5. Departemen Farmakologi dan Terapeutik fakultas Kedokteran UI. Jakarta. Hal 586-587
26. Kim JM, Marshal MR, Cornel JA, Boston JF, Wei Cl. 1995. *Antibacterial Activity of Carcacrol, Citral and Gweraniols Agains Salmonella thypimorium in Culture Medium and Fish Cubes*. J Food Sci. Hal 1365-1368
27. Gorman SP. 1991. *Mechanism of Action of Chemical Biocides Their Study and Exploitation*. London : Blackwell Scientifict Publication.
28. Prindle RF. 1983. *Phenolic Compounds. Edisi. Disinfection, Sterilization, and Preservative*. Lea and febiger: Phyladelphia.
29. Friedman M, Henika PR, Mandrel RE. 2003. *Antibacterial Activities of Phenolic Benzaldehydes and Benzoic Acid Agains Campylobacter jejuni, Escherichia coli, and Salmonelaenterica*. J Food Prot. Hal :181
30. Buchanan RE dan Gibbons NE. 1976. *Manual of Determinative Bacteriology*, edisi 8. The Williams and Wilkins Company. Baltimore. Hal 295,319
31. Djide, natsir dan sartini. *Analisis Mikrobiologi Farmasi*. Makassar : Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin. 2008. Hal 308, 321
32. Gholib, ibnu dan rohman abdul. *Kimia Farmasi Analisis*. Pustaka Pelajar. 2009. Hal 353-363
33. Arsyik I. 2011. *Aktivitas Antimikroba Ekstrak dan Fraksi Ekstrak Daun Rami Boehmeria virgata Terhadap Beberapa Mikroba*. Jtrop Phar. Chem (Indonesia). [Dikutip 01 April 2013]. Vol 1. No 2. Available from:

34. Sulandari L, Sulandjari S, Kristiastuti D. 2010. *Pengujian aktivitas Antimikroba dengan Metode Kontak Ekstraksi Biji Keluwak (Pagium udele) Terhadap Bakteri Escherichia coli dan Staphylococcus aureus. Jurnal Boga dan Gizi. [Dikutip 01 April 2013]. Vol 6. No 1. Available from: [://boga.jurnal.unesa.ac.id](http://boga.jurnal.unesa.ac.id)*
35. Parhusif A, 2006. *Kajian Mekanisme Antibakteri Ekstrak Andaliman (Zanrhoxilum acanthopodium DC) Terhadap Bakteri Patogen Pangan. IPB : Skripsi*

LAMPIRAN I

ALUR PENELITIAN



LAMPIRAN II

GAMBAR PENELITIAN

Sawo manila (*Manikara zapota* Linn.)



(a)



(b)

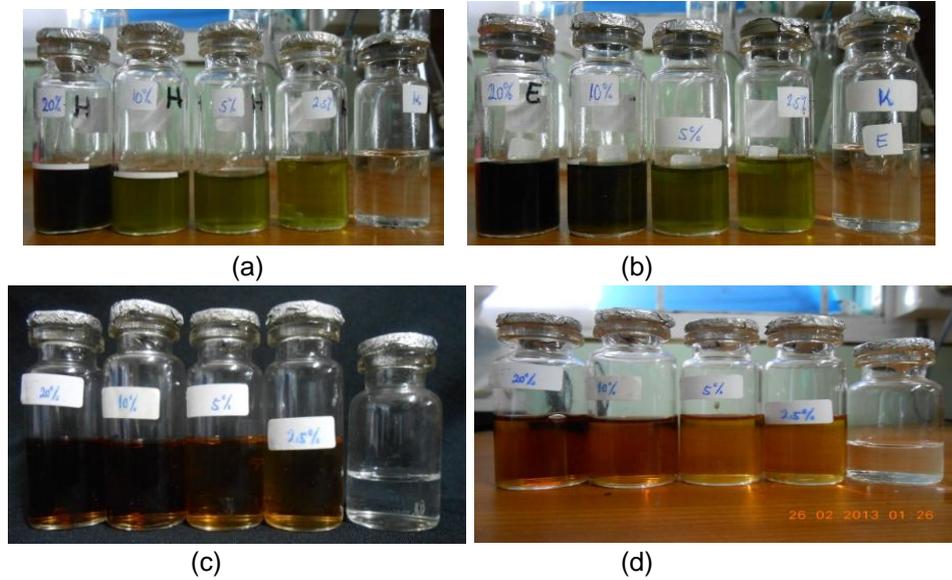
Gambar 12 : Foto Tumbuhan Sawo manila (*Manikara zapota* Linn.)

Keterangan :

(a) : Pohon utuh

(b) : Buah

Hasil Partisi

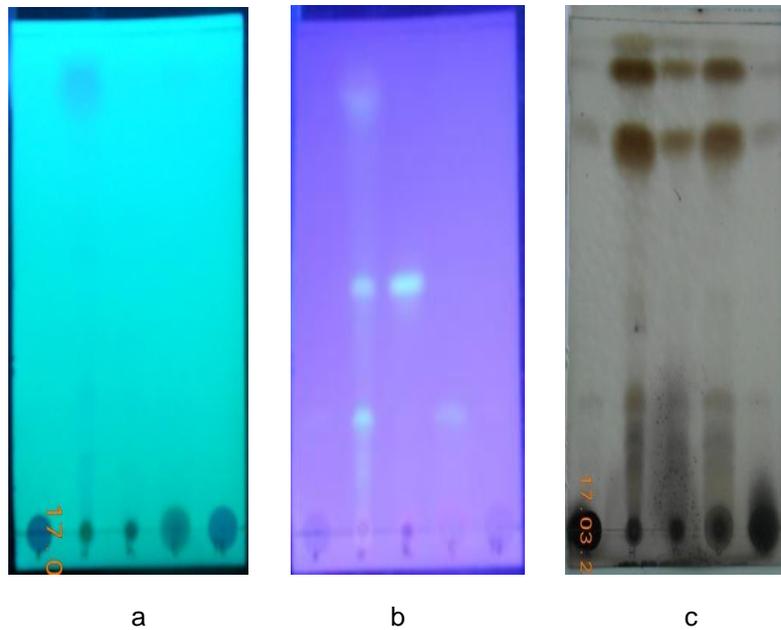


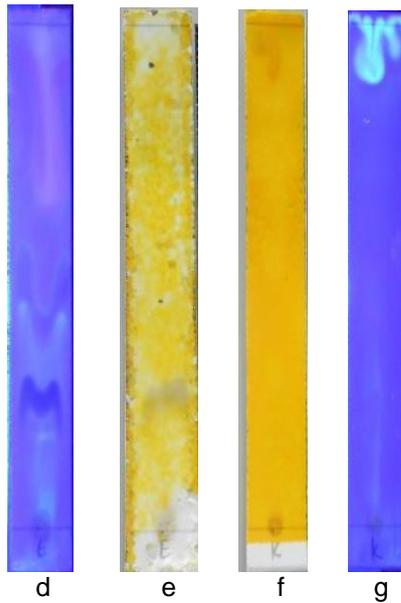
Gambar 13 : Foto ekstrak Sawo manila (*Manikara zapota* Linn)

Keterangan :

- (a) = n-heksan
- (b) = Etil asetat
- (c) = Tidak larut etil asetat
- (d) = Kloroform.

Profil KLT Dan Identifikasi





Gambar 13 : Foto profil KLT dan identifikasi senyawa dengan reagen semprot,
Keterangan :

a = Profil KLT ekstrak hasil partisi di bawah lampu UV366nm

b = Profil KLT ekstrak hasil partisi di bawah lampu UV254nm

c = Profil KLT ekstrak hasil partisi disemprot H_2SO_4

d = Hasil identifikasi ekstrak larut etil asetat dengan $AlCl_3$

e = Hasil identifikasi ekstrak larut etil asetat dengan Dragendorf

f = Hasil identifikasi ekstrak larut kloroform dengan Dragendorf

g = Hasil identifikasi ekstrak larut kloroform dengan $AlCl_3$

LAMPIRAN III

BAKTERI RESISTEN

Bakteri *Staphylococcus aureus*

LABORATORIUM MIKROBIOLOGI KLINIK
BAGIAN MIKROBIOLOGI
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS GADJAH MADA
Jl. Kesehatan, Sekip. Telp. (0274) 580297 Yogyakarta

Permintaan Dokter :
Nama Penderita :
Umur/ Jenis Kelamin :
Alamat/ No. Telp. :
Permohonan Pemeriksaan : Mikroskopik
 Kultur
 Uji Kepekaan
 Angka kuman

No. Lab. : 124
Bahan yang diperiksa : PUS
Tgl. Bahan diterima :
Tgl. Hasil dikirim :

HASIL PEMERIKSAAN BAKTERIOLOGI

MIKROSKOPIK :
BIAKAN : *Staphylococcus aureus*
ANGKA KUMAN :

Uji Kepekaan bakteri terhadap :	Bakteri I	Bakteri II	Bakteri III	Bakteri IV
Amikacin	R			
Amoxicillin	R			
Amoxicillin-Clav acid	R			
Ampicillin	R			
Erytromycin	R			
Gentamicin	R			
Levofloxacin	R			
Chloramphenicol	R			
Meropenem	R			
Penicillin G	R			
Cefepime	R			
Cefadroxil	R			
Cefixim	R			
Ceftriaxon	R			
Cefuroxim	R			
Ciprofloxacin	R			
Sulfamet-Trimetoprim	R			
Tetracyclin	R			
Cefoxitin	R			

Keterangan :
S : Sensitif R : Resisten / : Tidak diujikan

Kepala,

Jika ada keraguan terhadap hasil pemeriksaan
Harap ditanyakan ke Lab. Mikrobiologi Klinik
Bagian Mikrobiologi FK UGM

Bakteri *Escherichia coli*

**LABORATORIUM MIKROBIOLOGI KLINIK
BAGIAN MIKROBIOLOGI
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS GADJAH MADA
Jl. Kesehatan, Sekip. Telp. (0274) 580297 Yogyakarta**

Permintaan Dokter :	No. Lab. : 141
Nama Penderita :	Bahan yang diperiksa : urine
Umur/ Jenis Kelamin :	Tgl. Bahan diterima :
Alamat/ No. Telp. :	Tgl. Hasil dikirim :
Permohonan Pemeriksaan :	
<input type="checkbox"/> Mikroskopik	
<input type="checkbox"/> Kultur	
<input type="checkbox"/> Uji Kepekaan	
<input type="checkbox"/> Angka kuman	

HASIL PEMERIKSAAN BAKTERIOLOGI

MIKROSKOPIK :
 BIAKAN : *Escherichia coli*
 ANGKA KUMAN :

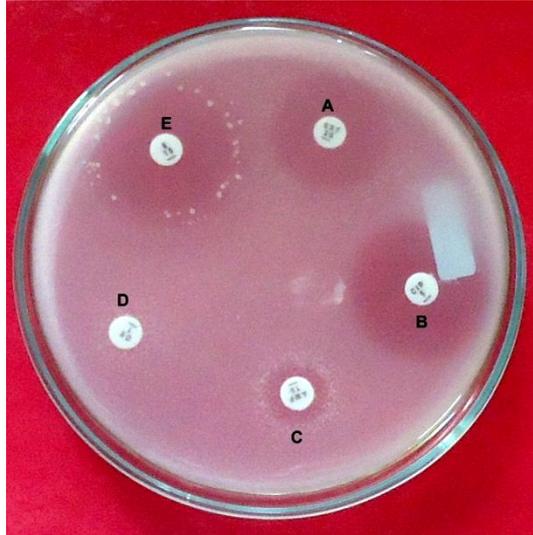
Uji Kepekaan bakteri terhadap :	Bakteri I	Bakteri II	Bakteri III	Bakteri IV
Amikacin	S			
Amoxicillin	R			
Amoxicillin-Clav acid	R			
Ampicillin	R			
Erytromycin	R			
Gentamicin	S			
Levofloxacin	S			
Chloramphenicol	R			
Meropenem	S			
Penicillin G	R			
Cefopime	S			
Cefadroxil	R			
Cefixim	S			
Ceftriakson	S			
Cefuroxim	S			
Ciprofloxacin	S			
Sulfamet-Trimetoprim	S			
Tetracyclin	R			

Keterangan :
 S : Sensitif R : Resisten / : Tidak diujikan

Kepala,

*Jika ada keraguan terhadap hasil pemeriksaan
 Harap ditanyakan ke Lab. Mikrobiologi Klinik
 Bagian Mikrobiologi FK UGM*

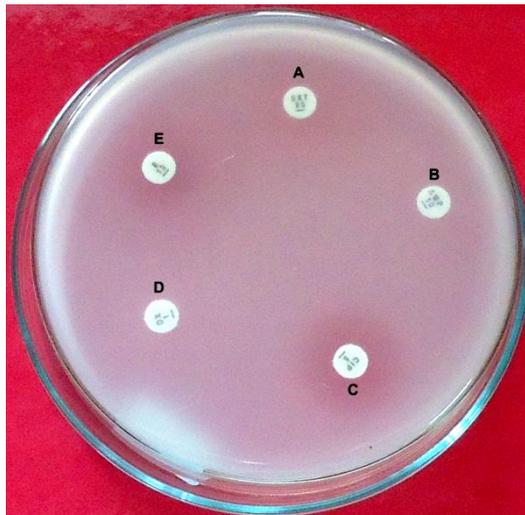
UJI RESISTENSI



Gambar 15 : uji kepekaan bakteri *Staphylococcus aureus* terhadap beberapa golongan antibiotik.

Keterangan :

- A : Sulfametoksazol (17,83 mm / Resisten 10 mm)
- B : Ciprofloxacin (23,25 mm / Resisten 15 mm)
- C : Ampisilin (9,86 mm / Resisten 13 mm)
- D : Oxasilin (- / Resisten ≤ 10 mm)
- E : Eritromisin (24,73 mm / Resisten 13 mm)



Gambar 16 : uji kepekaan bakteri *Escherichia coli* terhadap beberapa golongan antibiotik.

Keterangan :

- A : Sulfametoksazol (- / Resisten 10 mm)
- B : Ampisilin (- / Resisten 13 mm)
- C : Ciprofloxacin (11,95 mm / Resisten 15 mm)
- D : Oxasilin (- / Resisten ≤ 10 mm)
- E : Eritromisin (10,18 mm / Resisten 13 mm)

