

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI METABOLIT SEKUNDER DARI
EKSTRAK KOMBINASI ALGA COKLAT (*Padina* sp.) DENGAN JERUK
NIPIS (*Citrus aurantifolia*), SERTA UJI BIOAKTIVITASNYA SEBAGAI
ANTIBAKTERI**

AGUNG DWIANTO

H031 18 1034



**DEPARTEMEN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2022**

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI METABOLIT SEKUNDER DARI
EKSTRAK KOMBINASI ALGA COKLAT (*Padina* sp.) DENGAN JERUK
NIPIS (*Citrus aurantifolia*), SERTA UJI BIOAKTIVITASNYA SEBAGAI
ANTIBAKTERI**

*Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat
untuk memperoleh gelar Sarjana Sains*

Oleh :

**AGUNG DWIANTO
H031 18 1034**



MAKASSAR

2022

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI METABOLIT SEKUNDER DARI
EKSTRAK KOMBINASI ALGA COKLAT (*Padina* sp.) DENGAN JERUK
NIPIS (*Citrus aurantifolia*), SERTA UJI BIOAKTIVITASNYA SEBAGAI
ANTIBAKTERI**

Disusun dan diajukan oleh

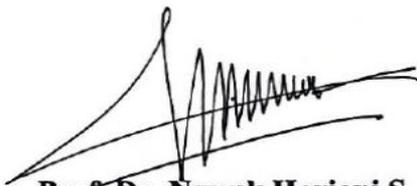
AGUNG DWIANTO

H031 18 1034

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Sidang Sarjana Program Studi
Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Hasanuddin
Pada 5 Desember 2022
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui,

Pembimbing Utama



Prof. Dr. Nunuk Hariani S., M.S.
NIP. 19601215 198702 2 001

Pembimbing Pertama



Syadza Firdausiah, S.Si., M.Sc.
NIP. 19900526 20190 3 013

Ketua Program Studi



Dr. St. Fauziah, M.Si.
NIP. 19720202 199903,2 002

PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Agung Dwianto
NIM : H031 18 1034
Program Studi : Kimia
Jenjang : S1

Menyatakan dengan ini bahwa Skripsi dengan judul “Isolasi dan Karakterisasi Metabolit Sekunder dari Ekstrak Kombinasi Alga Coklat (*Padina* sp.) dengan Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*), serta Uji Bioaktivitasnya sebagai Antibakteri” adalah karya saya sendiri dan tidak melanggar hak cipta pihak lain. Apabila dikemudian hari terbukti bahwa sebagian atau keseluruhan skripsi ini adalah hasil karya orang lain yang saya gunakan dengan cara melanggar hak cipta pihak lain, maka saya bersedia menerima sanksi.

Makassar, 5 Desember 2022
Yang Menyatakan,



D97CEAKX112860893

Agung Dwianto

LEMBAR PERSEMBAHAN

“Bersukacitalah dalam pengharapan, sabarlah dalam kesesakan, dan bertekunlah dalam doa!” – Roma 12:12

PRAKATA

Puji syukur kepada Tuhan Yesus Kristus atas berkat, karunia dan kasih setiaNya yang sangat besar sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Isolasi dan Karakterisasi Metabolit Sekunder dari Ekstrak Kombinasi Alga Coklat (*Padina* sp.) dengan Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*), Serta Uji Bioaktivitasnya Sebagai Antibakteri” sebagai salah satu syarat memperoleh gelar Sarjana Sains pada Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin.

Limpahan rasa hormat dan terimakasih yang sangat tulus panulis persembahkan kepada orang tua tercinta, Ayah **Yulius Syarif** dan Ibu **Elizabeth** yang senantiasa mendukung dalam doa, dukungan moril, material, selalu sabar, serta selalu memberikan kasih sayang yang senantiasa mengiringi perjalanan penulis dalam menuntut ilmu. Buat kakak terkasih **Febbywanto** terima kasih atas segala perhatian, kepedulian, dukungan motivasi serta kasih sayang yang selalu terjalin antara kita berdua. Terima kasih pula kepada segenap keluarga besar yang selalu memberikan doa, dukungan, dan motivasi kepada penulis.

Ungkapan terima kasih dan penghargaan yang sebesar-besarnya kepada Ibu **Prof. Dr. Nunuk Hariani S., M.S.**, selaku pembimbing utama dan pembimbing akademik penulis, serta ibu **Syadza Firdausiah, S.Si., M.Sc.**, selaku pembimbing pertama penulis yang dengan sabar telah meluangkan waktu dalam membimbing penulis, memberikan bantuan biaya penelitian, memberikan banyak ilmu, dan memberikan saran serta solusi yang sangat berharga dari awal penelitian hingga tersusunnya skripsi ini. Penulis meminta maaf atas segala perilaku serta ucapan yang tidak berkenan selama penelitian hingga penyusunan skripsi ini.

Penulis juga mengucapkan terima kasih dan penghargaan sebesar-besarnya kepada:

1. Bapak **Dr. Abdul Karim, M.Si.**, selaku ketua penguji dan ibu **Bulkis Musa, S.Si., M.Si.**, selaku sekretaris penguji, terima kasih telah meluangkan waktu untuk memberikan saran dan masukan yang berharga kepada penulis dalam penyelesaian skripsi ini.
2. Ketua Departemen Kimia, ibu **Dr. St. Fauziah, M.Si.**, dan sekretaris Departemen Kimia, ibu **Dr. Nur Umriani Permatasari, M.Si.**, terima kasih atas motivasi dan bantuannya kepada penulis selama menempuh pendidikan.
3. Seluruh dosen di lingkungan FMIPA Unhas, terkhusus **Dosen Departemen Kimia FMIPA Unhas**, terima kasih telah banyak membagi ilmu dan motivasi kepada penulis selama menempuh pendidikan.
4. Seluruh **staf pegawai FMIPA Unhas** dan **staf pegawai Departemen Kimia FMIPA Unhas**, terima kasih atas bantuan dan kerjasamanya.
5. Kepala Laboratorium dan seluruh Staff Laboratorium Kimia Analitik, Kimia Anorganik, Kimia Fisika, Biokimia, Kimia Organik dan IPA Terpadu FMIPA Universitas Hasanuddin, terkhusus ibu **Kartini, S.i**, selaku staff Laboratorium Kimia Organik dan Laboratorium Kimia Terpadu. Terima kasih atas segala bantuan fasilitas yang telah diberikan kepada penulis selama menempuh pendidikan dan proses penelitian.
6. **Prof. Yana Maolana Syah, MS, Ph.D** selaku kepala Laboratorium Kimia Terpadu, Laboratorium Spektroskopi Massa dan NMR FMIPA Institut Teknologi Bandung, terima kasih atas segala bantuan fasilitas yang telah diberikan selama proses penelitian.

7. **Elby, Citra, Rika, Febri, Fade, Ratni, Mita, Fatriani, Hira, Anti, Ijul, Viny, dan Rara** sebagai sahabat seperjuangan semasa studi yang selalu mendukung, memberikan semangat dan motivasi kepada penulis.
8. Rekan-rekan kelompok penelitian kimia organik, terkhususnya tim panel penelitian **Fatin** dan **Pino** atas segala bantuan, dukungan, masukan, saran, doa dan semangat kepada penulis.
9. **Teman-teman seangkatan Kimia 2018** yang telah memberikan bantuan dan dukungan kepada penulis mulai dari awal perkuliahan hingga tahap ini.
10. **Kak Bahrn, ibu Khadijah, kak Musni, kak Nurul, kak Akbar, kak Maje, kak Putut, dan kak taufik** serta seluruh keluarga besar peneliti kimia organik yang telah memberi semangat, saran, motivasi serta selalu membantu dan membagi ilmu serta cerita selama penelitian.
11. Seluruh teman-teman anggota KMK Kom. FMIPA Unhas, GMKI Kom. FMIPA Unhas, dan PMKO MIPA-Farmasi Unhas untuk segala cerita dan tempat penulis melakukan pelayanan bersama-sama.
12. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu semoga Tuhan senantiasa membalas dengan berkat yang berlipat ganda.

Penulis menyadari bahwa apa yang disajikan dalam skripsi ini masih memiliki banyak kekurangan. Oleh karena itu, penulis mengharapkan kritikan dan saran yang bersifat membangun dari berbagai pihak. Akhirnya, penulis berharap semoga laporan hasil penelitian ini dapat memberikan manfaat kepada para peneliti selanjutnya dalam bidang Kimia Organik, khususnya bidang isolasi.

Makassar, 5 Desember 2022
Penulis,

Agung Dwianto

ABSTRAK

Penelitian isolasi, identifikasi, dan karakterisasi metabolit sekunder ekstrak kombinasi alga coklat (*Padina* sp.) dengan jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*), serta bioaktivitasnya sebagai antibakteri telah dilakukan. Penelitian dilakukan dengan terlebih dahulu mengekstraksi sampel kombinasi menggunakan metode maserasi bertingkat, kemudian dilanjutkan dengan fraksinasi dan pemurnian komponen-komponen yang terdapat dalam ekstrak. Isolat murni yang diperoleh dikarakterisasi menggunakan spektrofotometer FT-IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, HSQC, dan HMBC. Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi cakram terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus*. Hasil uji fitokimia menunjukkan ekstrak *n*-heksana kombinasi mengandung metabolit sekunder golongan alkaloid, steroid, dan kumarin. Ekstrak etil asetat kombinasi mengandung metabolit sekunder golongan alkaloid dan steroid. Ekstrak aseton kombinasi mengandung metabolit sekunder golongan fenolik, steroid, dan saponin, sedangkan untuk ekstrak metanol kombinasi mengandung metabolit sekunder golongan alkaloid, flavonoid, dan fenolik. Senyawa 5,7-dimetoksikumarin sebanyak 32 mg berhasil diisolasi dari ekstrak *n*-heksana kombinasi dengan titik leleh 142-144°C. Hasil uji antibakteri ekstrak *n*-heksana kombinasi menunjukkan aktivitas antibakteri yang lebih baik terhadap *E. coli* (15,42 mm) dan *S. aureus* (18,76 mm) apabila dibandingkan masing-masing ekstrak tunggalnya yang hanya memberikan diameter zona bening 8,11-13,21 mm terhadap kedua bakteri uji. Ekstrak metanol kombinasi menunjukkan aktivitas antibakteri terbesar terhadap bakteri *E. coli* (19,89 mm) dibandingkan ekstrak lainnya, namun terhadap bakteri *S. aureus* ekstrak *n*-heksana kombinasi menunjukkan penghambatan terbesar dibandingkan ekstrak yang lainnya dengan diameter zona bening 18,76 mm. Senyawa 5,7-dimetoksi kumarin pada konsentrasi 1% menunjukkan adanya penghambatan yang tergolong kuat terhadap kedua bakteri uji *E. coli* (11,71 mm) dan *S. aureus* (10,64 mm) sehingga berpotensi sebagai kandidat agen antibakteri.

Kata kunci: Kombinasi, Alga coklat (*Padina* sp.), Jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*), 5,7-dimetoksikumarin, Antibakteri.

ABSTRACT

Research on the isolation, identification, and characterization of secondary metabolites of the combined extract of brown algae (*Padina* sp.) and lime (*Citrus aurantifolia*), and its bioactivity as an antibacterial have been done. The research was conducted by first extracting the combined samples using the multilevel maceration method, then followed by fractionation and purification of the components contained in the extract. The pure isolates obtained were characterized using FT-IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, HSQC, and HMBC spectrophotometers. Antibacterial activity was tested by the disc diffusion method against *E. coli* and *S. aureus* bacteria. The results of the phytochemical test showed that the combined *n*-hexane extract contained secondary metabolites of alkaloids, steroids, and coumarins. The combined ethyl acetate extract contains secondary metabolites of the alkaloid and steroid groups. The combined acetone extract contains secondary metabolites of the phenolic, steroid, and saponin groups, while the combined methanol extract contains secondary metabolites of the alkaloid, flavonoid, and phenolic groups. 32 mg of 5,7-dimethoxycoumarin was isolated from the combined *n*-hexane extract with a melting point of 142-144°C. The antibacterial test results of the combined *n*-hexane extract showed better antibacterial activity against *E. coli* (15.42 mm) and *S. aureus* (18.76 mm) when compared to every single extract which only gave a clear zone diameter of 8.11-13.21 mm against both test bacteria. The combined methanol extract showed the greatest antibacterial activity against *E. coli* bacteria (19.89 mm) compared to other extracts, but the combined *n*-hexane extract showed the greatest inhibition against *S. aureus* bacteria compared to the other extracts with a clear zone diameter of 18.76 mm. Compound 5,7-dimethoxy coumarin at a concentration of 1% showed relatively strong inhibition of both test bacteria *E. coli* (11.71 mm) and *S. aureus* (10.64 mm) so it has the potential as an antibacterial agent candidate.

Keywords: Combination, Brown algae (*Padina* sp.), Lime (*Citrus aurantifolia*), 5,7-dimethoxycoumarin, Antibacterial.

DAFTAR ISI

	halaman
PRAKATA.....	vi
ABSTRAK.....	ix
ABSTRACT.....	x
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xviii
DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN.....	xix
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	7
1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian.....	7
1.3.1 Maksud Penelitian.....	7
1.3.2 Tujuan Penelitian.....	7
1.4 Manfaat Penelitian.....	8
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	9
2.1 Alga Coklat (<i>Padina</i> sp.).....	9
2.2 Bioaktivitas Metabolit Sekunder dalam Alga Coklat (<i>Padina</i> sp.)..	11
2.3 Jeruk Nipis (<i>Citrus aurantifolia</i>).....	16
2.4 Bioaktivitas Metabolit Sekunder dalam Jeruk Nipis.....	18

2.5 Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	22
2.6 Bakteri <i>Escherichia coli</i>	26
2.7 Bioaktivitas Kombinasi	29
2.8 Bioaktivitas Antibakteri	32
BAB III METODE PENELITIAN	36
3.1 Bahan Penelitian.....	36
3.2 Alat Penelitian	36
3.3 Waktu dan Tempat Penelitian	37
3.4 Prosedur Penelitian.....	37
3.4.1 Preparasi Sampel	37
3.4.2 Ekstraksi	37
3.4.3 Identifikasi Golongan Senyawa Kimia	38
3.4.3.1 Uji Alkaloid	38
3.4.3.2 Uji Flavonoid	39
3.4.3.3 Uji Fenolik	39
3.4.3.4 Uji Terpenoid/Steroid	39
3.4.3.5 Uji Saponin	39
3.4.3.5 Uji Kumarin	39
3.4.4 Fraksinasi dengan KKV	40
3.4.5 Pemurnian.....	40
3.4.6 Karakterisasi Senyawa	40
3.4.6.1 Penentuan Titik Leleh.....	40
3.4.6.2 Penentuan Struktur Kimia.....	41
3.4.7 Pengujian Aktivitas Antibakteri dengan Metode Difusi Cakram	41
3.4.7.1 Preparasi Sampel Ekstrak	42

3.4.7.2 Pembuatan Media <i>Nutrient Agar</i> (NA).....	42
3.4.7.3 Pembuatan Media <i>Muller Hinton Agar</i> (MHA) ...	42
3.4.7.4 Peremajaan Bakteri Uji <i>E. coli</i> dan <i>S. aureus</i>	42
3.4.7.5 Pengujian Antibakteri Menggunakan Metode Difusi Cakram.....	43
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	44
4.1 Preparasi Sampel	44
4.2 Ekstraksi	44
4.3 Identifikasi Golongan Senyawa Kimia.....	47
4.4 Fraksinasi dan Pemurnian Senyawa	48
4.5 Karakterisasi Senyawa	57
4.5.1 Uji Fitokimia	57
4.5.2 Analisis Menggunakan <i>Fourier-Transform Infra Red</i>	58
4.5.3 Analisis Menggunakan NMR 1 dimensi ($^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$) dan NMR 2 dimensi (HMBC dan HSQC).....	60
4.6 Pengujian Aktivitas Antibakteri dengan Metode Difusi Cakram	66
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	72
5.1 Kesimpulan.....	72
5.2 Saran.....	73
DAFTAR PUSTAKA	74
LAMPIRAN	86

DAFTAR TABEL

Tabel	halaman
1. Bioaktivitas antibakteri alga coklat (<i>Padina</i> sp.)	14
2. Bioaktivitas antibakteri jeruk nipis (<i>Citrus aurantifolia</i>).....	19
3. Bioaktivitas kombinasi bahan alam	31
4. Klasifikasi respon hambatan senyawa terhadap pertumbuhan bakteri ...	35
5. Hasil uji fitokimia ekstrak kombinasi alga coklat (<i>Padina</i> sp.) dan jeruk nipis (<i>Citrus aurantifolia</i>).....	47
6. Fraksi gabungan hasil KKV ekstrak <i>n</i> -heksana kombinasi.....	55
7. Data spektrum NMR 5,7-dimetoksikumarin dalam pelarut CD ₃ OD	66
8. Diameter zona hambat sampel uji terhadap bakteri uji	67

DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
1. Bentuk alga coklat <i>Padina</i> sp.....	11
2. Struktur senyawa terpenoid yang terdapat pada ekstrak kloroform <i>Padina tetrastromatica</i> ((2R,4S)-4-(asetil-2-hidroksi-2,6,6-trimetilsikloheksanon) [6], 4-((2R,4S)-4-asetil-2-hidroksi-2,6,6-trimetilsikloheksil)-but-3-en-2-on [7], dan loliolide [8])	12
3. Struktur senyawa steroid yang terdapat pada <i>Padina</i> sp. (Oxysterol [3], 7-ketokolesterol [4], dan 7- α -hidroksifukosterol [5]).....	13
4. Struktur senyawa yang terdapat pada ekstrak <i>Padina pavonia</i> (18,19- epoksi-19-metoksi-18-hidroksi-4-asetoksi-6,9,13-triena [1] dan 18,19- epoksi-18,19-dimetoksi-4-hidroksi-6,9,13-triena [2])	14
5. Bentuk jeruk nipis <i>Citrus aurantifolia</i>	17
6. Struktur senyawa yang terdapat pada ekstrak kulit buah <i>Citrus hystrix</i> (furanokumarin oksipeusedanin hidrat [9]).....	21
7. Struktur senyawa yang terdapat pada ekstrak etanol kulit jeruk nipis (β -pinen [10] dan D-limonen [11]).....	21
8. Struktur senyawa yang terdapat pada ekstrak jeruk nipis (visenin [11], vitexin [12], dan isovitexin [13]).....	22
9. Bentuk bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	23
10. Bentuk bakteri <i>Escherichia coli</i>	27
11. Rendamen fraksi ekstrak kombinasi.....	46
12. Kromatogram ekstrak kombinasi setelah dielusi menggunakan eluen <i>n</i> -heksana:etil asetat (8,5:1,5) (fraksi <i>n</i> -heksana (1), etil asetat (2), aseton (3), dan metanol (4)) dibawah UV <i>short wave</i> (a), dibawah UV <i>long wave</i> (b), dan setelah disemprot penampak noda Ce(SO ₄) ₂ (c).....	49
13. Kromatogram ekstrak <i>n</i> -heksana setelah dielusi menggunakan eluen <i>n</i> -heksana:etil asetat (9,5:0,5) [1], <i>n</i> -heksana:etil asetat (9:1) [2], <i>n</i> -heksana:etil asetat (8,5:1,5) [3], <i>n</i> -heksana:etil asetat (8:2) [4], <i>n</i> -heksana:etil asetat (7,5:2,5) [5], <i>n</i> -heksana:etil asetat (7:3)	

dibawah UV <i>short wave</i> (a), dibawah UV <i>long wave</i> (b), dan setelah disemprot penampak noda Ce(SO ₄) ₂ (c)	50
14. Kromatogram ekstrak <i>n</i> -heksana dengan Rf 0,3 dibawah UV <i>short wave</i> (a), dibawah UV <i>long wave</i> (b), dan setelah disemprot penampak noda Ce(SO ₄) ₂ (c)	51
15. Kromatogram elusi sebanyak 3x menggunakan eluen <i>n</i> -heksana:etil asetat (9,95:0,05) dibawah UV <i>short wave</i> (a), dibawah UV <i>long wave</i> (b), dan setelah disemprot penampak noda Ce(SO ₄) ₂ (c).....	52
16. .Kromatogram ekstrak <i>n</i> -heksana hasil fraksinasi KKV yang dielusi menggunakan eluen <i>n</i> -heksana:etil asetat (8,5:1,5) dibawah UV <i>short wave</i> (a), dibawah UV <i>long wave</i> (b), dan setelah disemprot penampak noda Ce(SO ₄) ₂ (c)	53
17. Kromatogram fraksi B sampai G hasil analisis KLT menggunakan eluen <i>n</i> -heksana:etil asetat (9,5:0,5) dibawah UV <i>short wave</i> (a), dibawah UV <i>long wave</i> (b), dan setelah disemprot penampak noda Ce(SO ₄) ₂ (c).....	54
18. Kromatogram fraksi P sampai X hasil analisis KLT menggunakan eluen <i>n</i> -heksana:etil asetat (8:2) dibawah UV <i>short wave</i> (a), dibawah UV <i>long wave</i> (b), dan setelah disemprot penampak noda Ce(SO ₄) ₂ (c).....	54
19. Fraksi F8.....	55
20. Kromatogram isolat 1 hasil analisis KLT menggunakan 3 sistem eluen yang berbeda, yaitu <i>n</i> -heksana:etil asetat (9:1) (1), <i>n</i> -heksana:etil asetat (8,35:1,65) (2), dan <i>n</i> -heksana:etil asetat (8:2) (3) dibawah UV <i>short wave</i> (a), dibawah UV <i>long wave</i> (b), dan setelah disemprot penampak noda Ce(SO ₄) ₂ (c)	56
21. Isolat 1	57
22. Hasil uji fitokimia senyawa 1 dibawah UV <i>long wave</i> tanpa penambahan NH ₄ OH 10% (a) dan penambahan NH ₄ OH 10% (b).....	58
23. Spektrum FT-IR isolat 1	59
24. Struktur kerangka dasar kumarin	59
25. Spektrum ¹³ C-NMR isolat 1	60
26. Spektrum ¹ H-NMR isolat 1	61

27. Spektrum HSQC isolat 1	62
28. Korelasi HSQC isolat 1	63
29. Spektrum HMBC isolat 1	64
30. Korelasi HMBC isolat 1	65
31. Struktur molekul isolat 1	65

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	halaman
1. Bagan alir penelitian	86
2. Bagan prosedur penelitian.....	87
3. Perhitungan persentase rendemen ekstrak kombinasi.....	95
4. Perhitungan pembuatan larutan untuk untuk pengujian antibakteri.....	97
5. Spektrum FT-IR Isolat 1	99
6. Spektrum ^{13}C -NMR Isolat 1.....	100
7. Spektrum Spektrum ^1H -NMR Isolat 1	101
8. Spektrum Spektrum HSQC Isolat 1	102
9. Spektrum Spektrum HMBC Isolat 1	103
10. Daya hambat sampel uji terhadap bakteri uji.....	104
11. Dokumentasi Penelitian.....	105

DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN

BHA	= <i>Beta Hydroxy Acid</i>
FTIR	= <i>Fourier Transform Infra Red</i>
HSQC	= <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
HMBC	= <i>Heteronuclear Multiple Bond Coherence</i>
IL-1	= Interleukin-1
IL-4	= Interleukin-4
ISK	= Infeksi Saluran Kemih
KHM	= Konsentrasi Hambat Minimum
KKV	= Kromatografi Kolom Vakum
KLT	= Kromatografi Lapis Tipis
MHA	= <i>Muller Hinton Agar</i>
NA	= <i>Nutrient Agar</i>
NMR	= <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
TGF- β	= <i>Transforming Growth Factor-Beta</i>
TNF- α	= <i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>
UPEC	= <i>Uropathogenic Escherichia coli</i>

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara kepulauan dengan kekayaan sumber daya alam yang sangat besar yang didukung oleh adanya sumber daya hayati dan non hayati yang bernilai tinggi. Laut menjadi salah satu sumber daya alam dengan potensi yang sangat besar untuk dikembangkan, di mana dua per tiga wilayah Indonesia merupakan lautan (Durand, 2010). Laut Indonesia memiliki keanekaragaman biota laut yang sangat bervariasi dan tidak dimiliki oleh negara-negara lain, sehingga Indonesia disebut negara yang memiliki keanekaragaman biota laut tertinggi di dunia (Pratiwi, 2006). Hasil biota laut yang menempati posisi penting dalam produksi perikanan Indonesia yaitu rumput laut atau alga laut (KKP RI, 2018). Indonesia merupakan produsen rumput laut terbesar kedua setelah Tiongkok, dengan volume ekspor tahun 2020 sebesar 195.574 ton (KKP RI, 2021). Alga laut yang tumbuh liar pada perairan pesisir Indonesia memiliki banyak potensi yang dapat dikembangkan lebih lanjut dalam pengobatan. Beberapa penelitian sebelumnya terhadap alga laut menunjukkan adanya berbagai metabolit sekunder yang memiliki sifat bioaktif, bahkan telah ditemukan beberapa molekul yang bermanfaat sebagai antikanker, antibakteri, dan antivirus (Bold dan Wynne, 1978).

Alga laut dapat diklasifikasikan menjadi tiga kelompok besar berdasarkan komposisi kimianya, yaitu alga hijau (*Chlorophyta*), alga merah (*Rhodophyta*), dan alga coklat (*Phaeophyta*) (Nursid dkk., 2013). Alga coklat merupakan sumber

daya alam laut yang sangat melimpah dengan kurang lebih 134 spesies yang tumbuh secara alami di perairan pesisir Indonesia (Limantara dan Heriyanto, 2011). Salah satu spesies alga coklat yaitu *Padina* sp. yang diketahui berpotensi sebagai antibakteri alami dengan kandungan senyawa aktif tanin, flavonoid, steroid, fukosantin, pigmen *xanthophyll*, fukoxantol, karotenoid, dan alkaloid (Wijayanti dkk., 2020). Hal tersebut dibuktikan oleh beberapa penelitian mengenai ekstrak *Padina* sp. yang efektif menghambat pertumbuhan bakteri. Izzati (2007) menyatakan ekstrak metanol *Padina* sp. memiliki daya hambat terhadap bakteri *Vibrio harveyi*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Pseudomonas pavanaceae*, *P. syntata*, dan *P. tetrolens*.

Padina sp. dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dengan daya hambat untuk ekstrak dietil eter dengan konsentrasi 100 ppm (9,49 mm), 250 ppm (9,63 mm), 500 ppm (9,82 mm), 750 ppm (9,67 mm), dan 1000 ppm (9,94 mm) yang termasuk dalam kategori sedang karena tidak lebih dari 10 mm. Sedangkan pada ekstrak etil asetat dengan konsentrasi 100 ppm (12,66 mm), 250 ppm (13,64 mm), 500 ppm (13,94 mm), 750 ppm (15,12 mm), dan 1000 ppm (17,06 mm) termasuk dalam kategori kuat. Selanjutnya pada ekstrak etanol termasuk kategori sedang untuk ekstrak dengan konsentrasi 100 ppm (7,59 mm), 250 ppm (8,17 mm), 500 ppm (9,32 mm), dan kategori kuat untuk konsentrasi 750 ppm (10,09 mm) dan 1000 ppm (10,57 mm) (Nuzul dkk., 2018). Kemudian menurut Haryani dkk., (2015) ekstrak etanol *Padina* sp. dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dengan daya hambat pada konsentrasi 60% (2,25 mm) termasuk kategori lemah, konsentrasi 80% (6,75 mm) termasuk kategori sedang, dan kategori kuat untuk konsentrasi 100% (14,37 mm).

Selain itu, beberapa turunan steroid yang dilaporkan memiliki aktivitas antibakteri telah berhasil diisolasi dari *Padina* sp., yaitu senyawa oxysterol dari ekstrak diklorometana *Padina pavonia* (Ktari dan Guyot, 1999), senyawa 7-ketokolesterol dari ekstrak *Padina tetrastromatica* (Parameswaran dkk., 1994), dan senyawa 7- α -hidroksifukosterol dari ekstrak *Padina crassa* (Tan dkk., 1992). Oleh karena itu, *Padina* sp. sangat berpotensi untuk dikembangkan sebagai agen antibakteri.

Selain biota laut, tanaman yang tumbuh di daratan juga banyak yang menunjukkan bioaktivitas yang baik sebagai antibakteri. Salah satunya ialah jeruk nipis. Jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) menjadi populer untuk diteliti karena memiliki beragam senyawa aktif yang memberikan berbagai macam aktivitas farmakologi. Salah satu bioaktivitas jeruk nipis yang telah banyak diteliti adalah aktivitas sebagai antibakteri karena kandungan senyawa kimia alkaloid, asam sitrat, asam askorbat, hesperidin, flavonoid, minyak atsiri, tanin, dan saponin yang terdapat baik pada ekstrak kulit buah, ekstrak daun, ekstrak biji serta air perasan jeruk nipis yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri (Pathan, 2012).

Aibinu dkk., (2007) pada penelitiannya terhadap ekstrak etanol buah jeruk nipis efektif menekan pertumbuhan bakteri *S. aureus* (sangat kuat), *Enterococcus faecalis* (kuat), *E. coli* (kuat), *Shigella flexnerii* (kuat), *Salmonella paratyphi* (kuat), *Citrobacter* sp. (kuat), *Serratia* sp. (sangat kuat), *Pseudomonas aeruginosa* (kuat), dan *Klebsiella pneumoniae* (kuat) serta antijamur *Candida albican* (sangat kuat). Kemudian Sari dkk., (2021) dalam penelitiannya melaporkan ekstrak perasan kulit buah jeruk nipis efektif menekan pertumbuhan bakteri *E. coli* dengan kategori sangat kuat pada konsentrasi 100% (26,69 mm), 75% (24,76 mm), 50% (23,37 mm), dan termasuk kategori kuat pada konsentrasi 25%

(19,43 mm). Hasil penelitian Agape (2019) menyatakan ekstrak etanol kulit buah jeruk nipis dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* dengan kategori lemah pada konsentrasi 25% (2,82 mm), 50% (4,32 mm), dan kategori sedang pada konsentrasi 75% (5,69 mm), dan 100% (6,83 mm). Kemudian hasil Penelitian Dwiyanti (2018) menunjukkan zona hambat air perasan jeruk nipis terhadap pertumbuhan *E. coli* termasuk kategori sedang pada konsentrasi 40% (7,25 mm), kategori kuat pada konsentrasi 50% (13,25 mm), 60% (14,25 mm), 70% (16 mm), 80% (17 mm), 90% (18,25 mm), dan termasuk kategori sangat kuat pada konsentrasi 100% (20,75 mm). Sedangkan hasil penelitian Razak (2013), memperlihatkan adanya aktivitas hambatan air perasaan jeruk nipis terhadap pertumbuhan bakteri *S. aureus* yang termasuk kategori sedang pada konsentrasi 25% (5,167 mm), 50% (6,167 mm), 75% (7,7 mm), dan termasuk kategori kuat pada konsentrasi 100% (10,5 mm).

Beberapa penelitian sebelumnya telah menunjukkan potensi *Padina* sp. dan jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) sebagai antibakteri khususnya terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* (gram positif) dan *Escherichia coli* (gram negatif). Kedua bakteri ini merupakan patogen invasif yang berpotensi tinggi menyebabkan berbagai penyakit infeksi, salah satunya infeksi yang terjadi pada ibu nifas (Wong dkk., 2015). Penelitian Arianpour dkk., (2009) melaporkan sekitar 6077 pasien nifas di Rumah Sakit Khanevadah dari tahun 2003 sampai dengan 2008 sebanyak 461 pasien diantaranya mengalami infeksi nifas. Adapun bakteri yang berhasil diisolasi antara lain *Streptococcus pyogenes* (6,7%), *Streptococcus agalactiae* (7,3%), *Peptococcus* sp. (10,7%), *Staphylococcus aureus* (7,9%), *Staphylococcus saprophyticus* (5,8%), *Bacteroids* sp. (10,9%), *E. coli* (9,3%), *Gardnerella*

vaginalis (6,8%), dan *Chlamydia trachomatis* (2,3%). Parut (2015) melaporkan angka kejadian infeksi saluran kemih tidak bergejala (bakteriuria asimtomatis) pada kehamilan di RSUD DR Mohamad Soewandhie Surabaya sangat tinggi yaitu 27%, bakteri gram positif terbanyak ditemukan adalah *Staphylococcus aureus* (50%) dan bakteri gram negatif terbanyak yang ditemukan adalah *E. coli* (72%). Bakteriuria asimptomatik yang tidak diatasi berbahaya karena dapat menyebabkan beberapa komplikasi seperti pielonefritis, kelahiran prematur, berat badan bayi lahir rendah, abortus, preeklampsia, sepsis dan kematian bayi.

Penelitian mengenai bioaktivitas senyawa metabolit sekunder pada bahan alam telah banyak dilakukan namun sebagian besar penelitian yang dilakukan hanya berfokus kepada bahan tunggalnya. Padahal pencampuran atau kombinasi bahan alam memiliki potensi yang memberikan hasil lebih baik (Halimatussa'diah dkk., 2014). Interaksi antara metabolit sekunder pada dua tumbuhan yang berbeda akan saling mempengaruhi bioaktivitas dari masing-masing tumbuhan tersebut karena beberapa senyawa ada yang bersifat antagonis (melemahkan), ada yang bisa bersifat sinergis (meningkatkan efektivitas), dan beberapa memiliki efek pelengkap terhadap tumbuhan lain ketika digunakan secara bersamaan pada konsentrasi tertentu (Darwis dkk., 2012). Hasil penelitian yang dilakukan oleh Putri dkk., (2017) menunjukkan bahwa ekstrak kombinasi temu putih (*Curcuma zedoaria*) dan temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) memiliki aktivitas antibakteri yang tidak lebih baik dibandingkan ekstrak tunggalnya. Penelitian yang menggunakan ekstrak kombinasi dilakukan juga oleh Airadion dkk., (2019) yang mengkombinasikan ekstrak kunyit (*Curcuma longa*) dan daun kelor (*Moringa oleifera*). Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak kombinasi kunyit dan daun

kelor yang diujikan terhadap tikus albino memiliki penghambatan ulkus yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak tunggal kunyit dan daun kelor.

Kombinasi tumbuhan dapat dilakukan dengan cara membandingkan aktivitas dari beberapa variasi komposisi masing-masing ekstrak, seperti pada penelitian yang dilakukan oleh Sambodo (2019) yang mengkombinasikan ekstrak alga merah (*Eucheuma cottoni*) dan ekstrak kulit buah lemon (*Citrus limon* L.) dengan perbandingan ekstrak yaitu 1:1, 2:1, dan 1:2. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa pada perbandingan 2:1 merupakan kombinasi yang menghasilkan bioaktivitas yang paling baik dibandingkan bioaktivitas masing-masing ekstrak tunggal. Pengembangan juga dapat dilakukan dengan mengkombinasikan simplisia atau serbuk tumbuhan sebelum diekstraksi, salah satunya adalah penelitian Afifah (2015) yang menggabungkan 3 simplisia tumbuhan yaitu jeringau, temu mangga, dan bawang putih dengan 3 varian komposisi yang diekstraksi menggunakan etanol serta diuji aktivitas antioksidannya. Nilai IC_{50} kombinasi simplisia tersebut lebih rendah dibandingkan dengan nilai IC_{50} ketiga tumbuhan tersebut tanpa dikombinasi yang menandakan bahwa metabolit sekunder dari kombinasi ketiga tumbuhan tersebut memiliki aktivitas yang sinergis sehingga menghasilkan bioaktivitas yang semakin baik.

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka penelitian ini dilakukan untuk mengisolasi, mengkarakterisasi, dan menguji aktivitas antibakteri metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak kombinasi alga coklat (*Padina* sp.) dan jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* (gram positif) dan *Escherichia coli* (gram negatif) yang merupakan patogen invasif yang

berpotensi tinggi menyebabkan berbagai penyakit infeksi. Diharapkan bioaktivitas antibakteri kombinasi kedua bahan *Padina sp.* dan *Citrus aurantifolia* dapat lebih optimal apabila dibandingkan hanya menggunakan bahan tunggalnya.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini yaitu:

1. golongan metabolit sekunder apa yang terdapat dalam ekstrak kombinasi alga coklat (*Padina sp.*) dan jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*)?
2. bagaimana struktur metabolit sekunder yang berhasil diisolasi dari ekstrak kombinasi alga coklat (*Padina sp.*) dan jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*)?
3. bagaimana aktivitas antibakteri ekstrak dan isolat dari kombinasi alga coklat (*Padina sp.*) dan jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap bakteri *S. aureus* dan *E. coli*?

1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian

1.3.1 Maksud Penelitian

Maksud dari penelitian ini adalah untuk mengetahui golongan metabolit sekunder yang terdapat dalam ekstrak kombinasi alga coklat (*Padina sp.*) dan jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*), mengetahui struktur metabolit sekunder yang berhasil di isolasi, serta menentukan aktivitas antibakteri ekstrak dan isolat dari ekstrak kombinasi tersebut terhadap bakteri *S. aureus* dan *E. coli*.

1.3.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini yaitu:

1. menganalisis golongan metabolit sekunder yang terdapat dalam ekstrak kombinasi alga coklat (*Padina sp.*) dan jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*).

2. mengisolasi dan mengelusidasi struktur metabolit sekunder yang ada pada ekstrak kombinasi alga coklat (*Padina* sp.) dan jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*).
3. menganalisis aktivitas antibakteri ekstrak dan isolat dari ekstrak kombinasi alga coklat (*Padina* sp.) dan jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap bakteri *S. aureus* dan *E. coli*.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberi informasi mengenai hubungan aktivitas antibakteri metabolit sekunder yang terdapat pada ekstrak dan isolat yang dihasilkan dari ekstraksi hingga proses isolasi kombinasi simplisia alga coklat (*Padina* sp.) dan jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*). Selain itu, penelitian ini juga diharapkan dapat memberi informasi mengenai cara mengisolasi dan mengarakterisasi metabolit sekunder dari bahan alam.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Alga Coklat (*Padina* sp.)

Alga merupakan bagian terbesar dari kingdom plantae yang hidup di laut, dan secara morfologi dapat digolongkan *thallophyta* karena tidak memiliki perbedaan pada susunan morfologi seperti akar, batang, dan daun. Secara keseluruhan tanaman ini mempunyai morfologi yang mirip walaupun sebenarnya berbeda. Bagian-bagian alga secara umum terdiri dari *holdfast* yaitu bagian dasar dari alga yang berfungsi menempel pada substrat dan thallus. Alga yang mempunyai bentuk dan ukuran tubuh besar disebut makroalga dan alga yang mempunyai bentuk dan ukuran tubuh kecil disebut mikroalga (Subagio dan Kasim, 2019). Alga memperoleh atau menyerap makanan melalui sel-sel yang terdapat pada thallusnya. Nutrisi terbawa oleh arus air yang mengenai alga akan diserap sehingga alga dapat tumbuh dan berkembangbiak. Perkembangbiakan alga melalui dua cara yaitu generatif dan vegetatif (Juneidi, 2004).

Rohmimohtarto dan Juwana (2007) memaparkan sebagian besar makroalga mempunyai warna indah yang disebabkan dalam plastidanya terdapat zat warna derivat klorofil, yaitu klorofil a dan b atau kedua-duannya. Terdapat pula zat warna lain berupa *fikosianin* (warna biru), *pikosantin* (warna pirang), dan *fikoeritrin* (warna merah) yang justru terkadang lebih menonjol sehingga dapat menutupi warna hijau dari klorofil pada jaringan sehingga menyebabkan alga dapat diklasifikasikan berdasarkan warna tersebut, yaitu *Cyanophyta* (alga

hijau-biru), *Chlorophyta* (alga hijau), *Rhodophyta* (alga merah), dan *Phaeophyta* (alga coklat).

Phaeophyta (alga coklat) merupakan jenis alga yang memiliki ukuran besar. Alga coklat merupakan kelompok alga laut penghasil algin (alginofit) yang merupakan senyawa hidrokoloid. Senyawa alginat merupakan suatu polimer panjang yang disusun oleh dua unit monomerik, yaitu β -D-mannuronic acid dan α -L-guluronic acid. Jenis alga coklat yang berasal dari kelas ini yang terutama sebagai penghasil algin adalah *Sargassum* sp., *Cystoseira* sp., *Padina* sp., dan *Turbinaria* sp. (Draget dkk., 2005). Perairan Indonesia terdapat sekitar 28 spesies alga coklat yang berasal dari enam genus yakni *Dyctyota*, *Sargassum*, *Padina*, *Hormophysa*, *Turbinaria*, dan *Hydroclathrus*. Spesies alga coklat yang telah diidentifikasi yaitu *Sargassum* sebanyak 14 spesies, *Turbinaria* sebanyak 4 spesies, *Hormophysa* 1 spesies, *Padina* 4 spesies, *Dyctyota* 5 spesies, dan *Hydroclathrus* 1 spesies (Ode dan Wasahua., 2014).

Padina sp. merupakan alga yang tersebar luas di perairan Indonesia berasal dari divisi *phaeophyta* (alga coklat). Habitat dari *Padina* sp. tersebar di perairan laut, khususnya di perairan laut yang dingin, mulai perairan laut dangkal hingga perairan laut dalam dan biasanya menempel pada batu karang baik di tempat terbuka maupun tempat yang terlindung. Thallus *Padina* sp. berbentuk lembaran yang lebar seperti kipas dengan diameter 3-4 cm yang tumbuh dalam lingkaran konsentris. *Padina* sp. mempunyai tubuh buah yang terdiri dari *hold-fast* (seperti akar), *stipe* (seperti batang), *blade* (seperti daun) (Trono dan Fortes, 1988).



Gambar 1. Bentuk alga coklat (*Padina* sp.) (Guiry, 1997)

Padina sp. berwarna coklat kekuningan dan ada yang memutih karena terdapat perkapuran. Pigmen warna coklat pada alga coklat disebabkan adanya pigmen dominan yaitu *fucoxanthin* dan pigmen *xanthophyll* (Draget dkk., 2005). Menurut Rachmat dkk., (1999) terdapat empat spesies *Padina* sp. di Indonesia yang telah diidentifikasi, antara lain *Padina javonica*, *Padina australis*, *Padina commersonii*, dan *Padina tetrastomatica*. Bentuk dari alga coklat *Padina* sp. dapat dilihat pada Gambar 1 dan klasifikasi *Padina* sp. menurut Tjitrosoepomo (2011) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Plantae
Divisi : Phaeophyta
Kelas : Phaeophyceae
Ordo : Dictyotales
Famili : Dictyotaceae
Genus : *Padina*
Spesies : *Padina* sp.

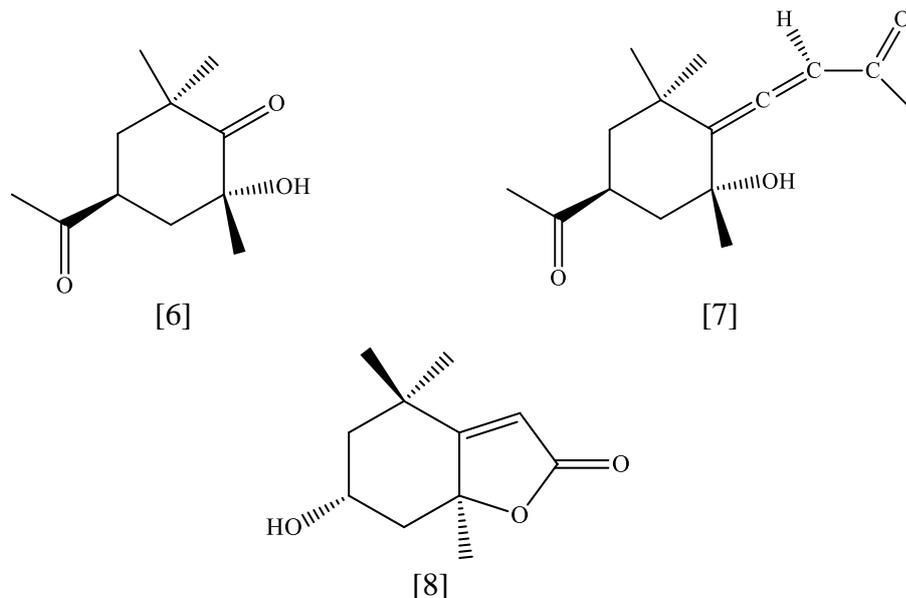
2.2. Bioaktivitas Metabolit Sekunder dalam Alga Coklat (*Padina* sp.)

Wijayanti dkk., (2020) telah melakukan skrining fitokimia ekstrak etanol *Padina* sp. dari Kepulauan Poteran Madura yang dilaporkan mengandung

metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, steroid, terpenoid, tannin, dan saponin. Hasil tersebut sesuai dengan penelitian Maharany dkk., (2017) mengenai *Padina* sp. yang dilaporkan mengandung senyawa steroid, terpenoid, polifenol, saponin, alkaloid, flavonoid, dan tanin yang berpotensi sebagai antibakteri alami.

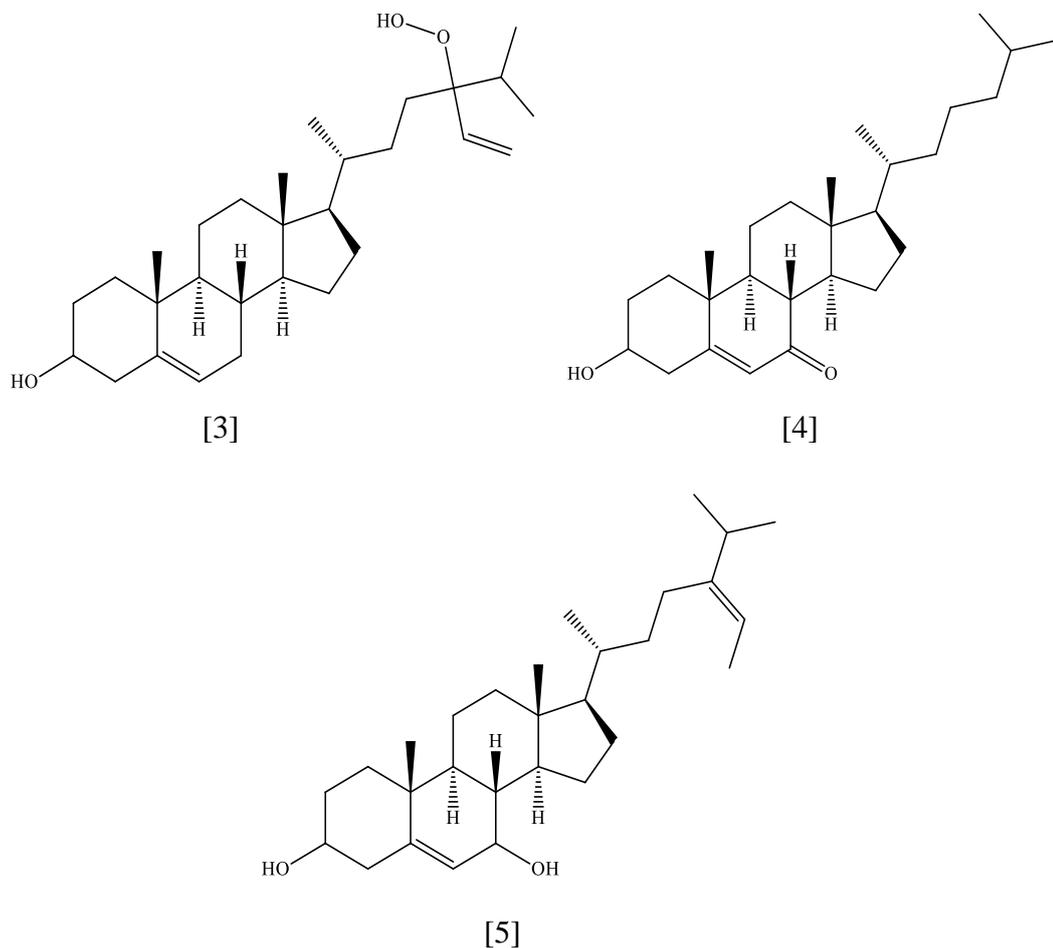
Beberapa senyawa telah berhasil diisolasi dari *Padina* sp. diantaranya pada ekstrak *n*-heksana berupa satu senyawa asam lemak dan satu senyawa triterpenoid sedangkan ekstrak etilasetat berupa dua senyawa asam lemak dengan ikatan rangkap dua terkonjugasi dan satu senyawa steroid. Pada ekstrak metanol berupa fukosterol dan dua senyawa steroid-triterpenoid (Suganda dkk., 2007).

Beberapa senyawa terpenoid dari ekstrak kloroform *Padina tetrastromatica* telah berhasil diisolasi Parameswaran dkk., (1996), yaitu (2R,4S)-4-(asetil-2-hidroksi-2,6,6-trimetilsikloheksanon), 4-((2R,4S)-4-asetil-2-hidroksi-2,6,6-trimetilsikloheksil)-but-3-en-2-on, dan loliolide yang ditunjukkan pada Gambar 4, yang dikarakterisasi menggunakan spektroskopi FTIR, UV-Vis, dan NMR.



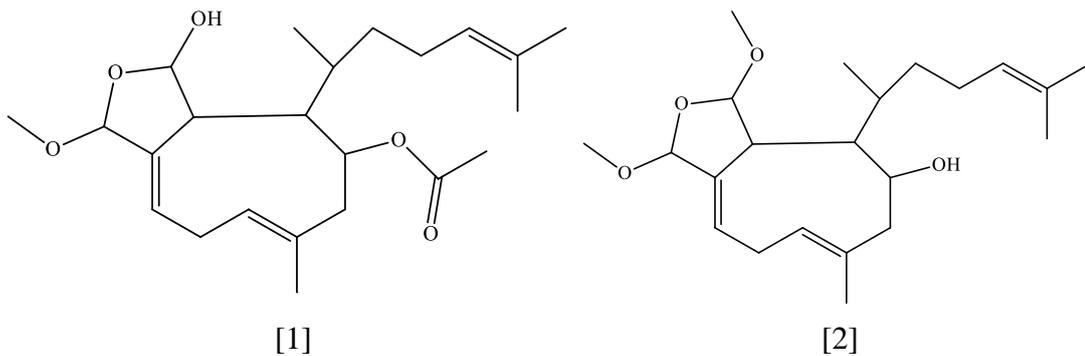
Gambar 2. Struktur senyawa terpenoid yang terdapat pada ekstrak kloroform *Padina tetrastromatica* ((2R,4S)-4-(asetil-2-hidroksi-2,6,6-trimetilsikloheksanon) [6], 4-((2R,4S)-4-asetil-2-hidroksi-2,6,6-trimetilsikloheksil)-but-3-en-2-on [7], dan loliolide [8])

Beberapa turunan steroid yang berhasil diisolasi dari *Padina* Sp. yaitu senyawa oxysterol dari ekstrak diklorometana *Padina pavonia* (Ktari dan Guyot, 1999), senyawa 7-ketokolesterol dari ekstrak *Padina tetrastromatica* (Parameswaran dkk., 1994), dan senyawa 7- α -hidroksifukosterol dari ekstrak *Padina crassa* (Tan dkk., 1992) yang ditunjukkan pada Gambar 3.



Gambar 3. Struktur senyawa steroid yang terdapat pada *Padina* sp. (Oxysterol [3], 7-ketokolesterol [4], dan 7- α -hidroksifukosterol [5])

Awad dkk., (2008), berhasil mengisolasi senyawa 18,19-epoksi-19-metoksi-18-hidroksi-4-asetoksi-6,9,13-triena dan senyawa 18,19-epoksi-18,19-dimetoksi-4-hidroksi-6,9,13-triena yang memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel H460 dan HepG2 dari ekstrak *Padina pavonia* yang ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 4. Struktur senyawa yang terdapat pada ekstrak *Padina pavonia* (18,19-epoksi-19-metoksi-18-hidroksi-4-asetoksi-6,9,13-triena [1] dan 18,19-epoksi-18,19-dimetoksi-4-hidroksi-6,9,13-triena [2])

Alam (2015) menyatakan bahwa *Padina* sp. merupakan salah satu jenis alga coklat yang berpotensi sebagai sumber bahan antibakteri alami dengan kandungan senyawa bioaktif yang dimilikinya. Hal tersebut dibuktikan oleh beberapa penelitian mengenai ekstrak *Padina* sp. yang efektif menghambat pertumbuhan bakteri yang dapat dilihat pada Tabel 1:

Tabel 1. Bioaktivitas antibakteri alga coklat (*Padina* sp.)

Jenis Alga Coklat (<i>Padina</i> sp.)	Pelarut	Bioaktivitas
<i>Padina australis</i> (Haryani dkk., 2015)	Etanol	Antibakteri <i>Escherichia coli</i> dengan daya hambat kategori lemah-kuat.
<i>Padina australis</i> (Sari dkk., 2016)	Etanol	Antibakteri <i>Porphyromonas gingivalis</i> dengan daya hambat kategori kuat.
<i>Padina australis</i> (Gazali dan Safutra, 2016)	Metanol	Antibakteri <i>Vibrio harveyi</i> dengan daya hambat kategori kuat dan sedang.
<i>Padina australis</i> (Salosso dkk., 2020)	Metanol dan air	Antibakteri <i>Aeromonas hydrophila</i> dengan diameter hambat 10 mm (ekstrak metanol) dan 10,5 mm (ekstrak air).

Lanjutan Tabel 1.

Jenis Alga Coklat (<i>Pandina</i> sp.)	Pelarut	Bioaktivitas
<i>Padina</i> sp. (Nuzul dkk., 2018)	Dietil eter, etil asetat, dan etanol	Antibakteri <i>Staphylococcus aureus</i> untuk ekstrak dietil eter kategori sedang. Sedangkan pada ekstrak etil asetat kategori kuat. Selanjutnya pada ekstrak etanol termasuk kategori sedang.
<i>Padina</i> sp. (Izzati, 2007)	Metanol	Antibakteri <i>Vibrio harveyi</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Pseudomonas pavanacae</i> , <i>Pseudomonas syntata</i> , dan <i>Pseudomonas tetrolens</i> .
<i>Padina australis</i> (Haryani dkk., 2015)	Etanol	Antibakteri <i>Vibrio cholerae</i> (diameter hambat 19,48 mm) dan <i>Salmonella typhi</i> (diameter hambat 12,0 mm).
<i>Padina boergessenii</i> (Kayalvizhi dkk., 2012)	Metanol dan kloroform	Antibakteri <i>C. albicans</i> terhadap ekstrak metanol. Antibakteri <i>A. flavus</i> , <i>E. coli</i> , dan <i>S. Aureus</i> .
<i>Padina pavonica</i> (Warsidah dkk., 2022)	Etanol dan etil asetat	Antibakteri <i>Escherichia coli</i> .
<i>Padina pavonica</i> (Dulger dan Dulger, 2014)	Etanol dan air	Antibakteri <i>S. Aureus</i> .
<i>Padina gymnospora</i> (Salem dkk., 2011)	Etil asetat dan metanol	Antibakteri <i>S. aureus</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Escherichia coli</i> , dan <i>Salmonella</i> sp.
<i>Padina pavonica</i> (Tuney dkk., 2006)	Etanol	Antijamur terhadap <i>Candida</i> dan <i>Enterococcus faecalis</i> serta antibakteri terhadap <i>Pseudomonas aeruginosa</i> dan <i>Escherichia coli</i> .
<i>Padina pavonica</i> (Ismail dkk., 2016)	Metanol	Antibakteri <i>S. aureus</i> , <i>S. typhimurium</i> , dan <i>Micrococcus</i> sp.

Lanjutan Tabel 1.

Jenis Alga Coklat (<i>Pandina</i> sp.)	Pelarut	Bioaktivitas
<i>Padina tetrastronica</i> (Kandhasamy dan Arunachalam, 2008)	Metanol	Antibakteri <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>M. luteus</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>S. aureus</i> , dan <i>P. aeruginosa</i> masing-masing dengan daya hambat kategori kuat.
<i>Padina australis</i> (Chiao-Wei dkk., 2011)	Metanol, diklorometana, dan <i>n</i> -heksana	Antibakteri <i>Escherichia coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , dan <i>Bacillus cereus</i> .
<i>Padina</i> sp. (Taherpour dkk., 2016)	<i>n</i> -heksana	Antibakteri <i>S. aureus</i> dengan diameter zona hambat 9 mm.
<i>Padina tetrastronica</i> (Ponnanikajamideen dkk., 2014)	Aseton, toluena, metanol, etil asetat, dan etanol	Antibakteri <i>Streptococcus</i> sp., <i>Proteus</i> sp., dan <i>Bacillus subtilis</i> .
<i>Padina boryana</i> Thivy (Sameeh dkk., 2016)	Etanol dan aseton	Antibakteri <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Moraxella catarrhalis</i> , <i>Serratia</i> sp., <i>Klebsiella pneumoniae</i> , dan <i>Micrococcus luteus</i> serta antijamur <i>Cryptococcus neoformans</i> .

2.3 Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*)

Buah jeruk merupakan salah satu jenis tanaman yang banyak tumbuh dan dikembangkan di Indonesia. Jeruk yang dibudidayakan di Indonesia dibagi menjadi 6 golongan besar, yaitu jeruk keprok (*Citrus nobilis* L.), jeruk siem (*Citrus microcarpa*), jeruk manis (*Citrus aurantium*), jeruk besar (*Citrus maximamus*), jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*), dan jeruk sambal (*Citrus hystrix*).

Jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) merupakan tumbuhan yang berasal dari Asia dan tumbuh subur pada daerah yang beriklim tropis. Tinggi pohon jeruk nipis sekitar 3-6 meter yang tumbuh subur pada tanah dengan kemiringan lereng sekitar 30° (Prastiwi dan Ferdiansyah, 2017).



Gambar 5. Bentuk jeruk nipis *Citrus aurantifolia* (Liana, 2017)

Akar tanaman jeruk nipis memiliki sistem perakaran tunggang dan mempunyai warna putih kekuningan (Ben dan Syukur, 2003). Jeruk nipis memiliki batang yang tergolong dalam batang berkayu (lignosus), berbentuk bulat (teres), berduri (spina) pendek, kaku dan juga tajam. Selain itu arah tumbuh batangnya mengangguk (nutans), dimana batangnya tumbuh tegak lurus ke atas tetapi ujungnya membengkok kembali ke bawah (Boekoesoe dan Jusuf, 2015).

Daun jeruk nipis berwarna hijau dan jika sudah tua warna kulitnya menjadi kuning dengan helaian daun berbentuk jorong, pangkal bulat, ujung tumpul, tepi beringgi, permukaan atas berwarna hijau tua mengkilap. Jeruk nipis memiliki bunga berukuran majemuk yang tumbuh di ketiak daun atau pucuk ranting yang masih muda dengan warna agak kemerahan hingga keunguan dan berbau harum karena banyak mengandung nektar (madu). Buahnya berbentuk bulat sebesar bola pingpong dengan diameter 3,5-5 cm, warna kulit luar hijau ketika masih muda dan bewarna kuning setelah tua atau masak (Liana, 2017).

Buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) dapat dilihat pada Gambar 5 dan klasifikasi *Citrus aurantifolia* menurut Ramadhianto (2017) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Plantae
Divisio : Spermatophyta
Subdivisio : Angiospermae
Kelas : Dicotyledonae
Ordo : Rutales
Famili : Rutaceae
Genus : *Citrus*
Spesies : *Citrus aurantifolia*

2.4 Bioaktivitas Metabolit Sekunder dalam Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*)

Tanaman jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) menjadi populer untuk diteliti karena memiliki beragam senyawa aktif diantaranya minyak atsiri, asam sitrat, eriocitrin, hesperidin, neoponcirin, limonene, dan feladren yang memberikan berbagai macam aktivitas farmakologi. Berdasarkan beberapa penelitian aktivitas farmakologi jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) diantaranya adalah antibakteri, antifungal, antioksidan, antikanker, sebagai pemutih gigi, larvasida nyamuk *Aedes aegypti*, dan antikolesterol (Prastiwi dan Ferdiansyah, 2017).

Salah satu bioaktivitas jeruk nipis yang telah banyak diteliti adalah aktivitas sebagai antibakteri karena kandungan senyawa kimia alkaloid, flavonoid, minyak atsiri, tanin, fenol, dan saponin yang terdapat baik pada ekstrak kulit buah, ekstrak daun, ekstrak biji serta air perasan jeruk nipis yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri (Pathan, 2012). Parama dkk., (2019) melaporkan terdapat beberapa senyawa kimia pada ekstrak metanol buah jeruk

nipis yaitu alkaloid, flavonoid, steroid, fenol, dan tanin. Sedangkan hasil skrining fitokimia simplisia dari daun jeruk nipis terdapat senyawa metabolit sekunder yaitu alkaloid, flavonoid, saponin, tanin dan asam organik (Reddy dkk., 2012). Hutapea (2000) melaporkan daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) mengandung senyawa alkaloid, polisakarida, flavonoid, dan minyak atsiri. Violeta dkk., (2010) melaporkan perasan jeruk nipis segar mengandung asam sitrat 6,15%, asam laktat 0,09%, serta sejumlah kecil asam tartarat.

Sarwono (2003) menjelaskan bahwa baik daun, buah maupun kulit jeruk nipis memiliki khasiat yang bermanfaat sebagai antibakteri karena mengandung minyak atsiri yang di dalamnya terkandung flavonoid yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri. Hal tersebut dibuktikan oleh beberapa penelitian mengenai ekstrak jeruk nipis yang efektif menghambat pertumbuhan bakteri yang dapat dilihat pada Tabel 2:

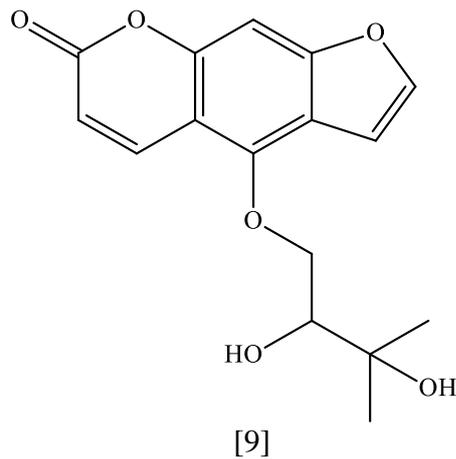
Tabel 2. Bioaktivitas antibakteri jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*)

Bagian Jeruk Nipis (<i>Citrus aurantifolia</i>)	Pelarut	Bioaktivitas
Kulit buah jeruk nipis (Sari dkk., 2021)	Air	Antibakteri <i>E. coli</i> pada konsentrasi 100%, 75%, 50%, dan 25% dengan zona hambat yang terbentuk sebesar 26,69 mm, 24,76 mm, 23,37 mm, dan 19,43 mm.
Kulit buah jeruk nipis (Agape, 2019)	Etanol	Antibakteri <i>Staphylococcus aureus</i> pada konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100% dengan zona hambat yang terbentuk sebesar 2,82 mm, 4,32 mm, 5,69 mm, dan 6,83 mm.
Kulit buah jeruk nipis (Wardani dkk., 2019)	Etanol dan etil asetat	Antibakteri <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , dan <i>P. aeruginosa</i> dengan konsentrasi hambat minimum pada konsentrasi 25%.

Lanjutan Tabel 2.

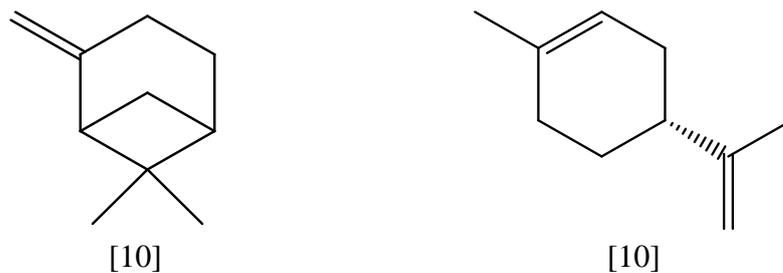
Bagian Jeruk Nipis (<i>Citrus aurantifolia</i>)	Pelarut	Bioaktivitas
Daun jeruk nipis (Siregar dkk., 2020)	Air	Antibakteri <i>Escherichia coli</i> dengan diameter zona hambat 11,7 mm pada konsentrasi 100%.
Daun jeruk nipis (Reddy dkk., 2012)	Etanol	Antibakteri <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Enterobacter faecalis</i> , dan <i>Staphylococcus aureus</i> .
Air perasaan jeruk nipis (Razak, 2013)	Air	Antibakteri <i>Staphylococcus aureus</i> pada konsentrasi 25% (5,167 mm), 50% (6,167 mm), 75% (7,7 mm), dan 100% (10,5 mm).
Air perasan jeruk nipis (Dwiyanti, 2018)	Air	Antibakteri <i>Escherichia coli</i> pada konsentrasi 40% (7,25 mm), 50% (13,25 mm), 60% (14,25 mm), 70% (16 mm), 80% (17 mm), 90% (18,25 mm), dan 100% (20,75 mm).
Biji buah jeruk nipis (Mohammed, 2016)	Etanol, kloroform, dan metanol	Antibakteri <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Klebsiella</i> sp., dan <i>Shigella</i> sp.
Buah jeruk nipis (Aibinu dkk., 2007)	Etanol	Antibakteri <i>Staphylococcus aureus</i> (sangat kuat), <i>Enterococcus faecalis</i> (kuat), <i>Escherichia coli</i> (kuat), <i>Shigella flexnerii</i> (kuat), <i>Salmonella paratyphi</i> (kuat), <i>Citrobacter</i> sp. (kuat), <i>Serratia</i> sp. (sangat kuat), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (kuat), dan <i>Klebsiella pneumoniae</i> (kuat) serta antijamur <i>Candida albican</i> (sangat kuat).
Buah jeruk nipis (Parama dkk., 2019)	Metanol	Antibakteri <i>Streptococcus mutans</i> dengan kategori lemah-kuat.

Munawaroh (2012) berhasil mengisolasi senyawa furanokumarin oksipeusedanin hidrat dari genus *Citrus*, yaitu senyawa furanokumarin oksipeusedanin yang ditunjukkan pada Gambar 6 dari fraksi etil asetat kulit buah *Citrus hystrix* dengan nilai konsentrasi hambat minimal dan konsentrasi bunuh minimal *S. epidermidis* berturut-turut 1,13 mg/ml; 2,25 mg/ml sedangkan terhadap *S. aureus* berturut-turut 0,56 mg/ml; 1,13 mg/ml.



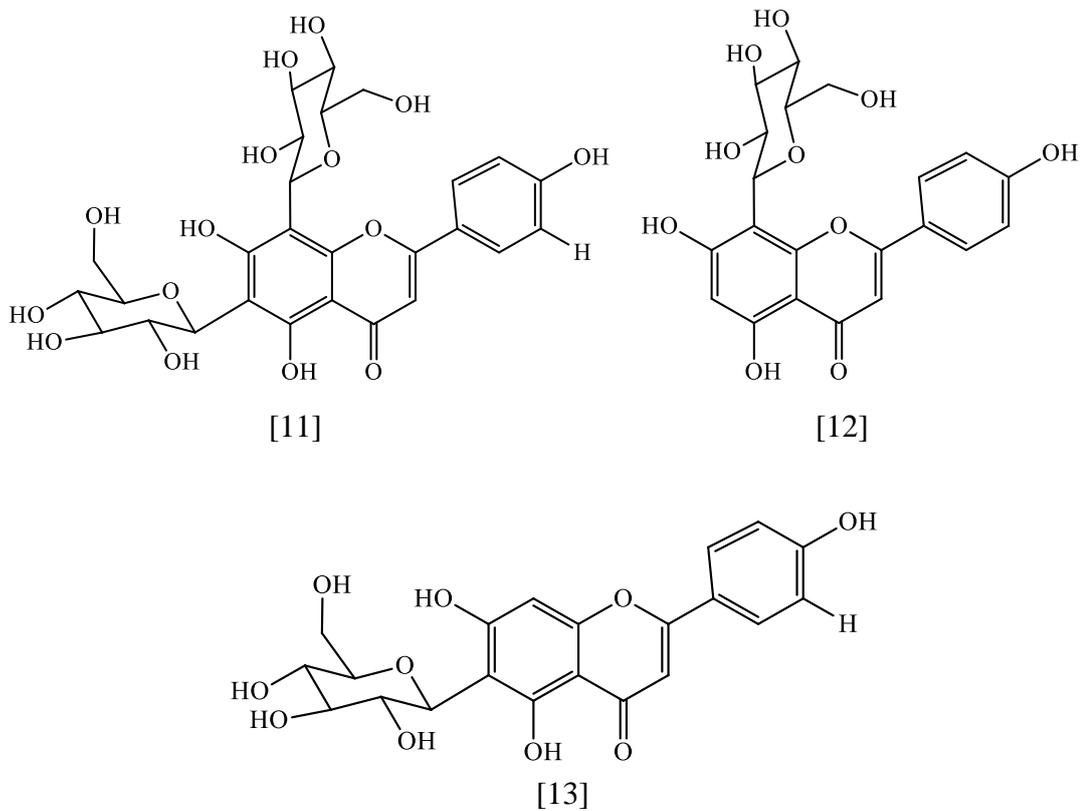
Gambar 6. Struktur senyawa yang terdapat pada ekstrak kulit buah *Citrus hystrix* (furanokumarin oksipeusedanin [9])

Mirawati (2021) melaporkan ekstrak etanol kulit jeruk nipis mengandung senyawa mayor golongan terpenoid berdasarkan hasil analisis GC-MS, yaitu D-limonen dan β -pinen yang aktif menghambat pertumbuhan bakteri *Bacillus cereus* dan *Escherichia coli* yang ditunjukkan pada Gambar 7.



Gambar 7. Struktur senyawa yang terdapat pada ekstrak etanol kulit jeruk nipis (β -pinen [10] dan D-limonen [11])

Sarwono (2003) menjelaskan flavonoid salah satu kandungan jeruk nipis yang berperan sangat penting dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Piccinelli dkk., (2008) berhasil mengisolasi senyawa golongan flavonoid dari ekstrak etanol jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) yaitu visenin, vitexin, dan isovitexin yang ditunjukkan pada Gambar 8.



Gambar 8. Struktur senyawa yang terdapat pada ekstrak jeruk nipis (visenin [11], vitexin [12], dan isovitexin [13])

2.5 Bakteri *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus merupakan flora normal yang ada di lingkungan dan tergolong bakteri gram positif berbentuk bulat dengan ukuran diameter 0,5-1,5 μm , mampu menghasilkan pigmen, kokus tunggal, berpasangan atau berbentuk rantai, namun umumnya hidup bergerombol dalam bentuk yang tidak teratur seperti setangkai buah anggur, tidak berkapsul, tidak berspora, dan *non*

motil (tidak bergerak) (Paryati, 2002). *Staphylococcus aureus* pada pembedihan padat membentuk koloni bulat, halus, mengikat, dan biasa membentuk koloni abu-abu hingga kuning emas (Jawetz, 2001).



Gambar 9. Bentuk bakteri *Staphylococcus aureus* (Center for Disease Control dan Prevention, 2019)

Staphylococcus aureus tumbuh pada suhu 6,5-46°C dan pada pH 4,2-9,3.

Bakteri ini umumnya ditemukan dalam udara, debu, limbah, tumbuh pada makanan dan menghasilkan enterotoksin namun tidak mempengaruhi penampilan luar dari makanan. *Staphylococcus aureus* mudah beradaptasi dengan lingkungan melalui ketahanannya terhadap antimikrobia (Ray dan Bhunia, 2008). Refdanita (2004) menambahkan resistensi *Staphylococcus aureus* terhadap antibiotik tertinggi berturut-turut untuk ampisilin, asamklavulanat, amoksisilin, penisilin G, sulbenisilin, kloramfenikol dan siprofloksasin. Bentuk dari bakteri *Staphylococcus aureus* dapat dilihat pada Gambar 9 dan klasifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* menurut Salle (1974) sebagai berikut:

Kingdom : Bacteria
Diviso : Protophyta
Sub divisio : Schizomycetea
Classis : Schizomycetes

Ordo : Eubacteriales
Familia : Micrococcaceae
Genus : *Staphylococcus*
Spesies : *Staphylococcus aureus*

Grundmann dkk., (2006) menyatakan bahwa *Staphylococcus aureus* merupakan salah satu dari penyakit infeksi yang telah dilaporkan mengalami peningkatan di seluruh dunia. Bakteri tersebut paling sering menyebabkan infeksi pada manusia karena bersifat patogen (Brooks dkk., 2005). *Staphylococcus aureus* sering menimbulkan infeksi nosokomial pada bayi, pasien luka bakar, dan pasien bedah di rumah sakit. *Staphylococcus aureus* juga dapat menyebabkan infeksi luka jahitan di daerah perineum sebanyak 50% (Guidice dkk., 2011). Selain itu, *Staphylococcus aureus* sering menyebabkan infeksi luka bekas operasi caesar (Nurkusuma, 2009). Pada organ reproduksi perempuan, *Staphylococcus aureus* dapat menyebabkan berbagai penyakit antara lain mastitis, endometritis, radang panggul, infeksi nifas, serviksitis, dan sepsis (Nuzul dkk., 2018).

Infeksi *Staphylococcus aureus* dipengaruhi oleh tipe permukaan dinding sel bakteri. Permukaan dinding sel *Staphylococcus aureus* mempunyai sifat hidrofobitas yang tinggi, sehingga memudahkan reaksi penempelan antara *Staphylococcus aureus* dengan sel epitel kelenjar mammae (Suwito dan Indarjianto, 2013). Zecconi dkk., (2006) menambahkan adanya protein ekstraseluler seperti kolagen dan fibronektin (Fn) yang memudahkan terjadinya reaksi penempelan antara *Staphylococcus aureus* dengan sel epitel kelenjar mammae. Reaksi penempelan *Staphylococcus aureus* dengan sel epitel kelenjar ada dua tipe yaitu reaksi spesifik dan non spesifik yang merupakan reaksi fisika kimia mammae.

Staphylococcus aureus merupakan salah satu bakteri yang umum diisolasi pada kasus infeksi. Terdapat sekitar 18.650 kasus infeksi oleh *Staphylococcus aureus* yang mengalami kematian dari 94.000 kasus infeksi yang terjadi secara keseluruhan di Amerika (Todar, 2008). Infeksi *Staphylococcus aureus* juga cukup tinggi di Asia, yaitu mencapai 70% pada tahun 2007. Sementara di Indonesia pada tahun 2006 mencapai 23,5% (Farmacia, 2008). Infeksi nifas merupakan salah satu infeksi yang sering disebabkan oleh bakteri *Staphylococcus aureus*. Berdasarkan penelitian Arianpour dkk., (2009) melaporkan sekitar 6077 pasien nifas di Rumah Sakit Khanevadah dari tahun 2003 sampai dengan 2008 sebanyak 461 pasien diantaranya mengalami infeksi nifas. Adapun bakteri yang berhasil diisolasi antara lain *Streptococcus pyogenes* (6,7%), *Streptococcus agalactiae* (7,3%), *Peptococcus* sp. (10,7%), *Staphylococcus aureus* (7,9%), *Staphylococcus saprophyticus* (5,8%), *Bacteroids* sp. (10,9%), *Escherichia coli* (9,3%), *Clostridium* sp. (2,1%), *Gardnerella vaginalis* (6,8%), dan *Chlamydia trachomatis* (2,3%).

Infeksi oleh *Staphylococcus aureus* ditandai dengan kerusakan jaringan yang menyebabkan aktivasi respon kekebalan tubuh. *Staphylococcus aureus* yang masuk ke dalam tubuh menghasilkan toksin berupa eksotoksin yang akan dipresentasikan oleh makrofag selaku sel penyaji *antigen presenting cell*. Ikatan makrofag dan bakteri memicu pelepasan sitokin proinflamasi seperti TNF- α , IL-1, IL-6, dan IL-8. Peningkatan konsentrasi TNF- α memiliki hubungan dengan syok sepsis dan kematian. Untuk mengimbangi pengeluaran sitokin proinflamasi berlebihan, tubuh mengaktifkan sitokin-sitokin antiinflamasi seperti IL-4, IL-10, dan sitokin respon perbaikan kerusakan yang disebabkan oleh peradangan dengan

menghasilkan *Transforming Growth Factor Beta* (TGF- β). Peran TGF- β adalah mempromosikan perbaikan jaringan dengan cara menghambat sitokin proinflamasi (Arianpour dkk., 2009).

Pengobatan terhadap infeksi *Staphylococcus aureus* biasanya menggunakan berbagai jenis antibiotik seperti tetrasiklin, vankomisin, dan penisilin. Perbedaan jenis obat yang diberikan dipertimbangkan dari angka resistensi bakteri terhadap suatu antibiotik, seperti hasil penelitian yang dilakukan oleh Listari (2009) menyatakan bahwa dari 361 kultur positif *Staphylococcus aureus* 67,9% masih sensitif terhadap seluruh antibiotik yang diujikan, 32,1% resisten terhadap satu atau dua agen antibiotik, 21,1% resisten terhadap satu jenis antibiotik dan 10,5% resisten terhadap dua atau lebih antibiotik. Antibiotik yang digunakan dalam penelitian tersebut adalah tetrasiklin, oxacillin, gentamicin, eritromicin, kloramfenikol dan trimetoprim-sulfametoxazole.

2.6 Bakteri *Escherichia coli*

Escherichia coli merupakan bakteri batang gram negatif yang tidak membentuk spora dan berasal dari famili *Enterobacteriaceae*. Bakteri *Escherichia coli* merupakan spesies dengan habitat alami dalam saluran pencernaan manusia maupun hewan. *Escherichia coli* mempunyai diameter 0,5 μm dan panjang 1,0 - 3,0 μm . *Escherichia coli* secara umum bersifat motil dalam cairan dan berfimbria (De-Sousa, 2006). *Escherichia coli* pertama kali diisolasi oleh Theodor Escherich dari tinja seorang anak kecil pada tahun 1885. *E. coli* merupakan bakteri anaerob fakultatif yang dapat mereduksi nitrat menjadi nitrit dan ketika difermentasikan di medium yang mengandung glukosa, akan memproduksi asam dan gas terutama H_2 dan CO_2 (Levinson, 2008).



Gambar 10. Bentuk bakteri *Escherichia coli* (Center for Disease Control dan Prevention, 2019)

Struktur sel *Escherichia coli* dikelilingi oleh membran sel, terdiri dari sitoplasma yang mengandung nukleoprotein. Membran sel *Escherichia coli* ditutupi oleh flagela, fimbriae, dan pili yang menjulur dari permukaan sel. Bakteri *Escherichia coli* merupakan bakteri gram negatif yang memiliki 150 tipe antigen O, 50 tipe antigen H, dan 90 tipe antigen K (Murwani, 2015). Bakteri *Escherichia coli* dapat menjadi patogen jika terkandung dalam jumlah yang banyak. Bakteri *Escherichia coli* yang patogen dapat tumbuh pada suhu rendah yaitu sekitar 7°C dan juga suhu tinggi yaitu sekitar 44°C tetapi pertumbuhan *Escherichia coli* lebih optimal pada suhu antara 35°C-37°C dan pH optimum 7-7,5. Selain itu, bakteri *Escherichia coli* dapat hidup ditempat lembab, relatif sensitif terhadap panas, dan akan mati dengan pasteurisasi atau proses pemasakan makanan dengan suhu yang relatif tinggi. Bentuk dari bakteri *Escherichia coli* dapat dilihat pada Gambar 10 dan klasifikasi bakteri *Escherichia coli* berdasarkan Levinson (2008) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Bacteria
Filum : Proteobacteria
Kelas : Gammaproteobacteria
Ordo : Enterobacteriales

Famili : Enterobacteriaceae
Genus : *Escherichia*
Spesies : *Escherichia coli*

Escherichia coli berada dalam jumlah besar pada usus manusia dan hewan, dimana umumnya tidak menyebabkan kerugian. Namun, dibagian lain dari tubuh, bakteri ini menyebabkan penyakit serius, seperti infeksi saluran kemih, bakteremia, dan meningitis. *Escherichia coli* merupakan agen penyebab yang mencakup lebih dari 95% kasus infeksi saluran kemih ibu nifas (Rahayu dkk., 2018). Laboratorium klinik Mikrobiologi Universitas Indonesia melakukan penelitian terhadap pasien ibu nifas yang terkena infeksi saluran kemih dan memperoleh jenis kuman yang terbanyak ialah *Escherichia coli* (19%) dan yang kedua ialah *Klebsiella pneumoniae* (13%) (Rahardjo dan Sualit, 1999).

Hasil penelitian Samirah dan Windarwati, (2006) didapatkan kuman yang terbanyak berhasil diisolasi dari ibu nifas penderita infeksi saluran kemih adalah *Escherichia coli* (14%), dengan kedua terbanyak *Acinetobacter calcoaceticus* (8%). Hasil penelitian Sumolang dkk., (2013) pada kultur urin ibu nifas penderita infeksi saluran kemih yang berjumlah 30 sampel di Instalasi Rawat Darurat Medik RSUP Prof. dr. R. D. Kandou Manado didapatkan 15 sampel yang menunjukkan adanya pertumbuhan kuman, dari 15 sampel tersebut ditemukan *Escherichia coli* merupakan mikro organisme tersering yang menyebabkan infeksi saluran kemih yaitu sebanyak 5 kasus (16,7%). Hal ini sesuai dengan hasil penelitian yang dilaporkan oleh Mahesh dkk., (2011) yang menemukan *Escherichia coli* sebagai jenis bakteri penyebab infeksi saluran kemih terbanyak.

Bakteri *Escherichia coli* masuk ke dalam tubuh dan menyebabkan infeksi melalui perlukaan pada traktus genitalia, berkolonisasi di serviks dan menuju uterus. Bakteri yang berkoloni di uterus saat nifas dapat menyebabkan peningkatan respon inflamasi dan terjadinya perubahan patologis yakni terhambatnya proses involusi uterus, meningkatkan risiko metritis dan endometritis. Peningkatan jumlah koloni *Escherichia coli* pada uterus memicu terjadinya respon imun di dalam tubuh, peningkatan aktivasi makrofag yang dapat mempengaruhi *innate immunity*. Makrofag yang teraktifasi akan memicu pelepasan sitokin proinflamasi seperti IL-1 β yang melebihi batas normal dapat berdampak pada kerusakan jaringan yang tak terkontrol yang berlanjut pada syok septik dan kematian (Nuzul dkk., 2018).

Agen *Uropathogenic Escherichia coli* (UPEC) adalah penyebab sebagian besar infeksi saluran kemih, termasuk sistitis dan pielonefritis, dan komplikasi infeksi yang dapat menyebabkan gagal ginjal akut pada individu sehat serta pada pasien transplantasi ginjal. Strain uropatogen *Escherichia coli* mempunyai faktor *adherence* yang disebut *P fimbriae* memediasi perlekatan *Escherichia coli* pada sel-sel uroepitelial. Oleh karena itu, pasien dengan saluran pencernaan yang mengandung *Escherichia coli* yang bermuatan *P fimbriae* di dalamnya lebih beresiko terkena infeksi saluran kemih (Irawan, 2018).

2.7 Bioaktivitas Kombinasi

Kombinasi bahan herbal telah digunakan dalam praktek obat-obatan sejak ribuan tahun yang lalu untuk meningkatkan efek terapeutik. Beberapa tumbuhan memiliki efek sinergis terhadap tumbuhan lain dan beberapa memiliki efek

pelengkap bagi tumbuhan lain (Wasito dkk., 2011). Beberapa penelitian menyatakan penggunaan kombinasi tumbuhan memiliki efek penyembuhan yang lebih ampuh jika dibandingkan dengan hanya menggunakan satu komponen tumbuhan dikarenakan setiap tumbuhan memiliki metabolit sekunder sehingga ketika tumbuhan tersebut digabungkan maka metabolit sekunder yang ada pada masing-masing tumbuhan tersebut akan saling berinteraksi (Hidayat, 2011).

Interaksi antara metabolit sekunder pada dua tumbuhan yang berbeda akan saling mempengaruhi bioaktivitas dari masing-masing tumbuhan tersebut karena beberapa senyawa ada yang bersifat antagonis (melemahkan) dan ada pula yang bisa bersifat sinergis (meningkatkan efektivitas) ketika digunakan secara bersamaan pada konsentrasi tertentu (Darwis dkk., 2012). Interaksi yang tidak sinergis dapat terjadi karena dalam masing-masing tumbuhan mengandung senyawa-senyawa bioaktif memiliki aktivitas yang berlawanan sehingga dapat mengganggu atau melemahkan kerja senyawa satu sama lain jika diberikan bersama atau digabung (Putri dkk., 2017). Sedangkan interaksi sinergis dapat terjadi apabila di dalam masing-masing tumbuhan memiliki berbagai senyawa bioaktif yang mempunyai aktivitas yang sama terhadap suatu target sehingga dapat saling menguatkan atau meningkatkan kerja senyawa satu sama lain jika diberikan bersama atau digabung (Sambodo, 2019).

Penelitian mengenai kandungan senyawa metabolit sekunder pada bahan alam telah banyak dilakukan namun sebagian besar penelitian yang dilakukan hanya berfokus kepada ekstrak tunggalnya padahal penggunaan kombinasi ekstrak dari tanaman herbal memiliki potensi memberikan hasil yang lebih baik. Hal ini

dibuktikan oleh beberapa penelitian mengenai bioaktivitas kombinasi bahan alam yang dapat dilihat pada Tabel 3:

Tabel 3. Bioaktivitas kombinasi bahan alam

Kombinasi Bahan Alam	Pelarut	Bioaktivitas
Kombinasi ekstrak etanol temu putih (<i>Curcuma zedoaria</i>) dan temulawak (<i>Curcuma xanthorriza</i>) (Putri dkk., 2017)	Etanol	Antibakteri <i>Streptococcus mutans</i> terhadap ekstrak tunggal dan kombinasi ekstrak tetapi kombinasi ekstrak tidak memiliki aktivitas antibakteri yang lebih baik dibandingkan masing-masing ekstrak tunggalnya.
Kombinasi ekstrak kunyit (<i>Curcuma longa</i>) dan daun kelor (<i>Moringa oleifera</i>) (Airaodion dkk., 2019)	Air	Kombinasi menunjukkan efek sinergis dalam penghambatan ulkus tikus albino dengan aktivitas yang lebih baik dibandingkan masing-masing ekstrak tunggalnya.
Kombinasi madu dan ekstrak <i>Nigella sativa</i> (Abdelmalek dkk., 2012)	Air	Kombinasi menunjukkan efek sinergis sebagai antibakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , dengan penurunan nilai konsentrasi hambat minimum ekstrak tunggal sebesar 77,77%.
Kombinasi madu dan ekstrak <i>Garcinia kola</i> (Akinnibosun dan Itedjere, 2013)	Air	Kombinasi menunjukkan efek sinergis sebagai antibakteri <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Salmonella</i> sp., dan <i>Pseudomonas aeruginosa</i> dengan nilai KHM dan KBM dari kombinasi yang lebih rendah dari ekstrak tunggalnya.

Lanjutan Tabel 3.

Kombinasi Bahan Alam	Pelarut	Bioaktivitas
Kombinasi ekstrak etanol kulit jeruk mandarin (<i>Citrus reticulata</i>) dan daun teh hijau (<i>Camellia sinensis</i>) (Nitami dkk., 2020)	Etanol	Kombinasi meningkatkan aktivitas antioksidan dari ekstrak daun teh, dengan nilai IC ₅₀ sebesar 83,00 µg/mL yang tergolong sebagai antioksidan yang kuat.
Ekstrak alga hijau (<i>Ulva lactuca</i> L.) dan lidah buaya (<i>Aloe vera</i> L.) (Septiawan dkk., 2020)	Etanol	Kombinasi menghasilkan aktivitas antioksidan yang lebih baik dibandingkan tanpa kombinasi.
Kombinasi ekstrak etanol daun sirsak (<i>Annona muricata</i>) dan daun jambu biji (<i>Psidium guajava</i>) (Wicaksono dan Ulfah, 2017)	Etanol	Kombinasi meningkatkan aktivitas antioksidan dari ekstrak daun Sirsak namun akan menurunkan aktivitas antioksidan ekstrak daun jambu biji secara signifikan pada kombinasi (2:1).
Kombinasi ekstrak alga merah (<i>Eucheuma cottoni</i>) dan ekstrak kulit buah lemon (<i>Citrus limon</i> L.) (Sambodo, 2019)	Etanol	Variasi kombinasi dapat memberikan efek sinergis (2:1) dan antagonis menengah (1:1) terhadap aktivitas antioksidan kombinasi sampel.

2.8 Bioaktivitas Antibakteri

Senyawa antibakteri merupakan senyawa kimiawi atau biologis baik alami maupun sintetik yang dapat menghambat aktivitas bakteri (Nurhayati dkk., 2020).

Senyawa yang dapat membunuh bakteri disebut bakterisidal sedangkan senyawa yang tidak membunuh namun dapat menghambat pertumbuhan bakteri disebut bakteriostatik (Pelczar dan Chan, 1988).

Beberapa golongan senyawa metabolit sekunder seperti saponin, flavonoid, tanin, dan steroid diduga memiliki efek sebagai antibakteri. Menurut Nuria dkk., (2009), saponin sebagai antibakteri bekerja dengan cara menurunkan tegangan permukaan sehingga mengakibatkan naiknya permeabilitas atau kebocoran sel bakteri dan diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler. Sedangkan flavonoid sebagai antibakteri bekerja dengan cara menghambat sintesis asam nukleat, menghambat fungsi membran sel dan menghambat metabolisme energi sehingga dapat merusak membran sel bakteri (Rijayanti, 2014). Mekanisme kerja tanin sebagai antibakteri menurut Ngajow dkk., (2013) berhubungan dengan kemampuan tanin dalam menginaktivasi molekul enzim yang terikat pada membran sel dan polipeptida dinding sel sehingga menyebabkan kerusakan pada dinding sel, kerusakan pada dinding sel akan menyebabkan kerusakan membran sel yaitu hilangnya sifat permeabilitas membran sel, sehingga keluar masuknya zat-zat tidak terseleksi. Sedangkan steroid sebagai antibakteri berhubungan dengan interaksinya terhadap membran fosfolipid sel yang bersifat permeabel terhadap senyawa-senyawa lipofilik sehingga menyebabkan integritas membran menurun serta morfologi membran sel berubah yang menyebabkan sel rapuh dan lisis (Ahmed, 2007).

Aktivitas antibakteri dapat dipelajari menggunakan beberapa metode, yaitu metode dilusi, metode difusi agar, dan metode difusi dilusi. Metode difusi adalah metode yang sering digunakan untuk analisis aktivitas antibakteri. Terdapat 3 cara dari metode difusi yang dapat dilakukan yaitu metode sumuran, metode cakram, dan metode silinder (Pratiwi, 2005). Prinsip kerja metode difusi adalah

terdifusinya senyawa antibakteri ke dalam media padat dimana mikroba uji telah diinokulasikan. Hasil pengamatan yang diperoleh berupa ada atau tidaknya daerah bening yang terbentuk di sekeliling kertas cakram yang menunjukkan zona hambat pada pertumbuhan bakteri (Balaouri dkk., 2016).

Metode sumuran dilakukan dengan membuat lubang yang dibuat tegak lurus pada agar padat yang telah diinokulasi dengan bakteri uji. Jumlah dan letak lubang disesuaikan dengan tujuan penelitian, kemudian lubang diisi dengan sampel yang akan diuji. Setelah dilakukan inkubasi, pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat ada tidaknya daerah hambatan di sekeliling lubang (Pelzcar dan Chan, 2006). Metode sumuran memiliki kelebihan yaitu lebih mudah mengukur luas zona hambat yang terbentuk karena bakteri beraktivitas tidak hanya di permukaan atas nutrisi agar tetapi juga sampai ke bawah. Pembuatan sumuran memiliki beberapa kesulitan seperti terdapatnya sisa-sisa agar pada suatu media yang digunakan untuk membuat sumuran, selain itu juga besar kemungkinan media agar retak atau pecah disekitar lokasi sumuran sehingga dapat mengganggu proses peresapan antibiotik ke dalam media yang akan memengaruhi terbentuknya diameter zona bening saat melakukan uji sensitivitas (Ari, 2019).

Metode cakram dilakukan dengan cara kertas cakram sebagai media untuk menyerap bahan antimikroba dijenuhkan ke dalam bahan uji. Setelah itu kertas cakram diletakkan pada permukaan media agar yang telah diinokulasi dengan biakan mikroba uji, kemudian diinkubasikan selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Area atau zona bening di sekitar kertas cakram diamati untuk menunjukkan ada tidaknya pertumbuhan mikroba (Bonang, 1992). Kelebihan dari metoda cakram yaitu dapat dilakukan pengujian secara lebih banyak dalam satu kali pengujian, tidak terlalu memerlukan tenaga yang banyak, dan lebih cepat pada penyiapan

cakram (Listari, 2009). Menurut David dan Stout (1971) efektifitas suatu senyawa antibakteri dapat diklasifikasikan berdasarkan respon hambatan senyawa terhadap pertumbuhan bakteri yang ditunjukkan pada Tabel 4:

Tabel 4. Klasifikasi respon hambatan senyawa terhadap pertumbuhan bakteri (David dan Stout, 1971)

Diameter Zona Bening (mm)	Respon Hambatan Pertumbuhan
<5	Lemah
5-10	Sedang
11-20	Kuat
21-30	Sangat Kuat

Menurut Robinson (2014) kerusakan bakteri merupakan hasil interaksi senyawa antibakteri dengan bagian tertentu pada sel bakteri. Bentuk dan besarnya perubahan atau kerusakan struktur sel dipengaruhi oleh jenis senyawa antibakteri, jenis bakteri, dan besarnya konsentrasi yang digunakan. Zona hambat atau aktivitas antibakteri terhadap bakteri gram positif lebih tinggi dibandingkan dengan bakteri gram negatif disebabkan karena pada umumnya bakteri gram negatif mempunyai resistensi yang lebih baik terhadap senyawa antibakteri karena memiliki struktur dinding sel yang lebih kompleks. Dinding sel bakteri gram positif sebagian besar tersusun atas peptidoglikan (95%), sedangkan dinding sel bakteri gram negatif tersusun atas lipidprotein, lipopolisakarida dan hanya mengandung sedikit peptidoglikan (5-10%). Lapisan lipopolisakarida ini memperkuat kekakuan dinding sel bakteri gram negatif melalui ikatan silang kationik intermolekuler (Holst, 2011). Hal inilah yang menyebabkan bakteri gram negatif menjadi lebih kokoh sehingga sulit ditembus oleh senyawa antibakteri sedangkan struktur dinding sel bakteri gram positif lebih sederhana sehingga memudahkan senyawa antibakteri masuk ke dalam sel (Septiani dkk., 2017).