



**UNIVERSITAS PANCASILA
PROGRAM MAGISTER ILMU KEFARMASIAN**

TESIS

**IDENTIFIKASI SENYAWA ANTI MIKROBA EKSTRAK ETANOL
BATANG BROTOWALI (*Tinospra crispa* (L.) Miers ex Hook
F. & Thomson) TERHADAP *Staphylococcus aureus*,
Bacillus substillis, DAN *Candida albicans*
DENGAN METODE KLT BIOAUTOGRAFI**

Oleh

**NUNUNG NURHAYATI
NPM : 5411220016**

**Disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Magister Farmasi pada Univeristas Pancasila**

**JAKARTA
2015**

**IDENTIFIKASI SENYAWA ANTI MIKROBA EKSTRAK ETANOL
BATANG BROTOWALI (*Tinospra crispa* (L.) Miers ex Hook
F. & Thomson) TERHADAP *Staphylococcus aureus*,
Bacillus substillis, DAN *Candida albicans*
DENGAN METODE KLT BIOAUTOGRAFI**

ABSTRAK

Tanaman brotowali (*Tinospra crispa* (L.) secara empiris telah digunakan untuk mengobati berbagai macam penyakit seperti penurunan panas, penghilang sakit, penambah nafsu makan, menurunkan kadar gula, obat sakit perut dan sebagai obat luar untuk luka dan gatal – gatal. Batang brotowali dilaporkan dipakai untuk mengobati penyakit infeksi karena mengandung senyawa flavonoid, saponin, tanin, glikosida. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi perkiraan senyawa yang memiliki aktivitas anti mikroba dengan metode bioautografi, GCMS dan spektrofotometri infra red. Ekstraksi dilakukan dengan pelarut etanol 96% dengan metode sokletasi dan di partisi menggunakan *n*-heksan dan etil asetat. Aktivitas anti mikroba diuji pada ekstrak etanol 96 % , fraksi *n*-heksan dan fraksi etil asetat dilakukan menggunakan metode difusi kertas cakram terhadap mikroba *Staphylococcus aureus*, *Bacillus substillis*, dan *Candida albicans*. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa ekstrak etanol 96%, fraksi etil asetat dan fraksi air tidak menunjukkan aktivitas anti bakteri. Hasil KLT fraksi *n*-heksan menghasilkan 4 bercak dengan diameter daerah hambat terbesar terhadap mikroba sehingga pengujian fraksi *n*-heksan dilanjutkan dengan metode bioautografi. Uji bioautografi menunjukkan bahwa aktivitas anti mikroba terlihat pada hrf 42,8, kemudian ekstrak dianalisa dengan spektrofotometri infra red dan GCMS. Analisa dengan spektrofotometri infra red menunjukkan adanya gugus-gugus fungsional CO, CH stretch, alkena(C=C), OH, sedangkan hasil analisa dengan GCMS dan prediksi identitas puncak-puncak yang diperoleh menggunakan database menunjukkan bahwa puncak terbesar adalah *octanoic acid*, *4 hydroxy-3-methoxy vanillin*, *phenol*, *2,4 bis(1,1-dimethyl ethyl, 2 pentadecanone*, *n-hexadecanoic palmitic acid*. Menurut pustaka senyawa *4 hydroxy-3 methoxy vanillin* dan *palmitic acid* dilaporkan memiliki aktivitas antimikroba.

Kata kunci : *Tinospora crispa* L, *n heksan*, *anti mikroba*, *KLT Bioautografi*, *spectrofotometri IR*, *GCMS*.

**IDENTIFICATION OF ETHANOL EXTRACT antimicrobial
compounds brotowali (*Tinospora crispa* (L.) Miers ex Hook
F.&Thomson.) AGAINST *Staphylococcus aureus*,
Bacillus substillis, *Candida albicans*
USING TLC BIOAUTOGRAPHY**

ABSTRACT

Brotowali (*Tinospora crispa* (L.)) empirically been used to treat various diseases such as fever, pain relievers, appetite enhancer, lowering blood sugar, abdominal pain medications and topically to wounds and itching. Trunkof Brotowali reported used to treat infectious diseases because it contains flavonoids, saponins, tannins, glycosides. This study aims to identify estimation of compounds that have the activity of anti-microbial using bioautografi, GCMS and spectrofotometri IR. Extraction is done with ethanol 96% with soxhletation and partitions using n-hexane and ethyl acetate. Testing the activity of anti-microbial ethanol extract 96%, the fraction of n-hexane and ethyl acetate fraction was performed using diffusion method paper disc against microbes *Staphylococcus aureus*, *Bacillus substillis*, and *Candida albicans*. The results obtained show that the extract of ethyl acetate and ethanol does not show anti-bacterial activity. TLC results of n-hexane to produce 4 spots with the greatest inhibition area diameter is of the n-hexane fraction against microbes so testing fraction of n-hexane followed by bioautography method. In the bioautography test shows that the anti-microbial activity seen in HRF 42.8, the extract was analyzed by infrared spectrophotometry (IR) and GCMS. Result with spectrophotometry IR analysis shows the functional groups of alkenes, CO, CH stretch, alkena(C=C), OH, while the results and prediction using GCMS obtained using the database shows that the biggest highlight is *octanoic acid*, *4-hydroxy-3-methoxy vanillin*, *phenol*, *2,4 bis (1,1-dimethyl ethyl, 2 pentadecanone*, *n-hexadecanoic palmitic acid*. According to the literature compound *4-hydroxy-3 methoxy vanillin* and *palmitic acid* are reported to have antimicrobial activity.

Key Words : *Tinospora crispa* L, *n-heksan*, *anti mikroba*, KLT bioautography, IR, GCMS

UNIVERSITAS PANCASILA
PROGRAM MAGISTER ILMU KEFARMASIAN

PERSETUJUAN TESIS
MAGISTER FARMASI
PEMINATAN: OBAT BAHAN ALAM

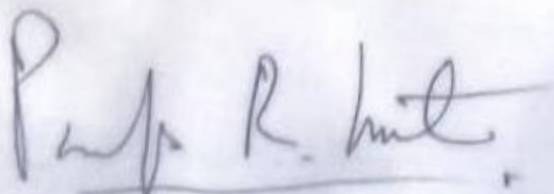
NAMA : NUNUNG NURHAYATI

NPM : 5411220016

JUDUL : IDENTIFIKASI SENYAWA ANTI MIKROBA EKSTRAK
ETANOL BATANG BROTOWALI (*Tinospra crispa* (L.) Miers ex
Hook F. & Thomson.) TERHADAP *Staphylococcus aureus*, *Bacillus*
substillis, DAN *Candida albicans* DENGAN METODE KLT
BIOAUTOGRAFI

DISETUJUI OLEH

Pemimbing I



Prof (ris). Dr. Partomuan Simanjuntak, M.Sc

Pemimbing II



Prof. Dr. Shirly Kumala, M. Biomed., Apt

UNIVERSITAS PANCASILA
PROGRAM MAGISTER ILMU KEFARMASIAN

PENGESAHAN TESIS
MAGISTER FARMASI
PEMINATAN: OBAT BAHAN ALAM

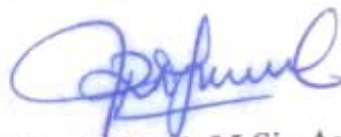
IDENTIFIKASI SENYAWA ANTI MIKROBA EKSTRAK ETANOL
BATANG BROTOWALI (*Tinospra crispa* (L.) Miers ex Hook
F. & Thomson) TERHADAP *Staphylococcus aureus*,
Bacillus substillis, DAN *Candida albicans* DENGAN
METODE KLT BIOAUTOGRAFI

Oleh

NUNUNG NURHAYATI
NPM : 5411220016

Dipertahankan dihadapan Penguji Tesis
Program Magister Ilmu Kefarmasian Universitas Pancasila
Pada Tanggal : 12 Desember 2015

Mengesahkan,
Ketua Program Magister Ilmu Kefarmasian



Dr. Ratna Djamil, M.Si., Apt

Penguji Tesis:

1. Dr. Ratna Djamil, M.Si., Apt
2. Dr. Agung Eru Wibowo, M.Si., Apt
3. Prof (ris). Swasono R Tamat, M.Sc., Apt
4. Prof (ris). Dr. Partomuan Simanjuntak, M.Sc
5. Prof. Dr. Shirly Kumala, M. Biomed., Apt



1. _____
2. _____
3. _____
4. _____
5. _____

PEDOMAN PENGGUNAAN TESIS

Tesis Magister Farmasi tidak dipublikasikan namun terdaftar dan tersedia di perpustakaan Universitas Pancasila Jakarta, dan terbuka untuk umum, dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Referensi kepustakaan diperkenankan dicatat. Tetapi pengutipan atau peringkasan hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai dengan kebiasaan ilmiah untuk menyebut sumbernya.

Memperbanyak atau menerbitkan sebagian atau seluruh isi tesis haruslah seizin ketua Program Pasca sarjana Universitas Pancasila, Jakarta.

Perpustakaan yang meminjam tesis ini untuk keperluan anggotanya harus mengisi nama dan tanda tangan peminjam dan tanggal peminjaman.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Allah SWT karena hanya berkat, rahmat, serta hidayah-Nya penelitian dan penyusunan tesis ini dapat diselesaikan dengan sebaik-baiknya.

Tesis ini berjudul “IDENTIFIKASI SENYAWA ANTI MIKROBA EKSTRAK ETANOL BATANG BROTOWALI (*Tinospra crispa* (L.) Miers ex Hook F. & Thomson.) TERHADAP *Staphylococcus aureus*, *Bacillus substillis*, DAN *Candida albicans* DENGAN METODE KLT BIOAUTOGRAFI” diajukan guna memperoleh gelar Magister Farmasi Universitas Pancasila.

Dalam penyusunan dan penyelesaian tesis ini banyak mendapatkan bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak. Oleh karena itu pada kesempatan ini izinkanlah penulis menyampaikan rasa hormat dan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada : Prof (ris). Dr. Partomuan simanjuntak, M.Sc selaku dosen pembimbing dan Prof. Dr. Shirly Kumala, M. Biomed., Apt selaku dosen pembimbing yang telah meluangkan waktu dan tenaga untuk memberikan bimbingan dan pengarahan dan diskusi sehingga penelitian dan penyusunan tesis ini dapat diselesaikan

Ucapan terima kasih juga saya tujukan kepada :

1. Ibu Dr. Ratna Djamil, M.Si., Apt selaku Ketua Program Magister Ilmu Kefarmasian Universitas Pancasila.
2. Bapak Prof (ris). Dr. Partomuan simanjuntak, M.Sc selaku dosen pembimbing yang telah membimbing saya dalam penyelesaian tesis ini.
3. Ibu Prof. Dr. Shirly Kumala, M. Biomed., Apt selaku pembimbing yang telah membimbing saya dalam penyelesaian tesis ini
4. Bapak dan Ibu staf pengajar program Magister Ilmu Kefarmasian Fakultas Farmasi, Universitas Pancasila, yang telah memberikan ilmu dan bimbingan kepada penulis selama masa perkuliahan.
5. Ibu Dr. Nina, M.Sc Staf Pusat Penelitian Kimia Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Jl. Raya Serpong, Tangerang.
6. Suami dan anak-anakku atas semua dukungan, perhatian, dorongan, semangat dan doa yang telah diberikan untuk penulis.

Akhir kata, tesis ini diharapkan dapat memberikan manfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan khususnya dibidang pengembangan bahan alam di Indonesia.

Jakarta, Desember 2015

Penulis

DAFTAR ISI

ABSTRAK.....	i
ABSTRACT.....	ii
HALAMAN PERSETUJUAN.....	iii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iv
HALAMAN PEDOMAN PENGGUNAAN TESIS.....	v
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR LAMPIRAN.....	x
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xii

BAB

I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang.....	1
B. Perumusan Masalah.....	3
C. Tujuan Penelitian.....	3
D. Manfaat Penelitian.....	4

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Uraian Tanaman.....	5
1. Klasifikasi Tanaman.....	5
2. Sinonim.....	5

3. Nama umum.....	5
4. Deskripsi.....	6
5. Asal dan Habitat.....	6
6. Bagian tanaman yang digunakan.....	6
7. Kandungan kimia.....	7
B. Ekstraksi.....	7
1. Simplisia.....	8
2. Ekstrak.....	8
3. Ekstraksi.....	8
4. Proses pembuatan ekstrak.....	8
5. Metode ekstraksi.....	9
C. Partisi.....	11
D. Penapisan Fitokimia.....	11
E. Antimikroba.....	14
F. Bioautografi.....	27
G. Spektrofotometri ultra violet – cahaya tampak.....	31
H. Spektrofotometri infrared.....	34

III RANCANGAN PENELITIAN

A. Prinsip Penelitian.....	37
B. Tempat Penelitian.....	37
C. Tahap Penelitian.....	38

IV BAHAN ALAT DAN METODE PENELITIAN

A. Bahan.....	39
B. Alat.....	39
C. Metode.....	39

V HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Determinasi.....	47
B. Ekstraksi etanol batang brotowali.....	47
C. Penapisan fitokimia.....	47
D. Uji aktivitas antimikroba metode difusi cakram.....	49
E. Uji bioautografi.....	53
F. Identifikasi senyawa kimia aktif ekstrak <i>n</i> -heksan batang brotowali (<i>Tinospora crisper</i> L) dengan kromatografi gas-spektrometri massa (GCMS) spektrofotometri infra red.....	53
G. Identifikasi senyawa kimia aktif ekstrak <i>n</i> -heksan batang brotowali (<i>Tinospora crisper</i> L) dengan spektrofotometri infra red.....	55

VI KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan.....	57
B. Saran.....	57

DAFTAR PUSTAKA.....	58
----------------------------	-----------

DAFTAR LAMPIRAN

LAMPIRAN 1. DETERMINASI BATANG BROLOWALI.....	61
LAMPIRAN 2. BATANG BROLOWALI (<i>TINOSPORA CRISPA</i>).....	62
LAMPIRAN 3. PERALATAN YANG DIGUNAKAN DALAM PENELITIAN.....	63
LAMPIRAN 4. ALUR KERJA PENELITIAN.....	64
LAMPIRAN 5. ALUR PENELITIAN PARTISI EKSTRAK BATANG BROLOWALI.....	65
LAMPIRAN 6. SKEMA KERJA UJI METODE BIOAUTOGRAFI.....	66
LAMPIRAN 7. UJI AKTIVITAS BAKTERI TERHADAP FASE <i>n</i> -HEKSAN, ETIL ASETAT, ETANOL FRAKSI AIR.....	67
LAMPIRAN 8. UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI DAN STANDAR STREPTOMISIN DENGAN TEKNIK DIFUSI CAKRAM....	69
LAMPIRAN 9. HASIL POLA KROMATOGRAM FRAKSI <i>n</i> -HEKSAN.....	71
LAMPIRAN 10. HASIL UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI <i>STAPHYLOCOCCUS</i> <i>AUREUS</i> FASE <i>n</i> -HEKSAN DENGAN METODE BIOAUTOGRAFI.....	73
LAMPIRAN 11. POLA KROMATOGRAM OCTANOIC ACID CAPRYLIC ACID NEO-FAT 8 OCTYLIC ACID.....	74
LAMPIRAN 12. POLA KROMATOGRAM BENZALDEHYDE, 4-HYDROXY -3-METHOXY-VANILLIN.....	76
LAMPIRAN 13. KROMATOGRAM PHENOL, 2,4-BIS(1,1-DIMETHYLETHYL) PHENOL, 2,4-DI-TERT-BUTYL.....	78
LAMPIRAN 14. POLA KROMATOGRAM HEXADECANOIC ACID PALMITIC ACID.....	80
LAMPIRAN 15. POLA KROMATOGRAM PHENOL, 4,4'-(1- METHYLETHYLIDENE)BIS-PHENOL, 4,4'- ISOPROPYLIDENE.....	82
LAMPIRAN 16. HASIL UJI SPEKTROFOTOMETRI IR FASE <i>n</i> -HEKSAN.....	85

DAFTAR GAMBAR

Gambar V.1 Pola Total kromatogram ekstrak *n*-heksan batang brotowali (*Tinospora crispa L*).

Gambar V.II. Pola Kromatogram dengan KLT.

DAFTAR TABEL

Tabel II.1 Serapan Khas beberapa gugus fungsi.....	36
Tabel V.1 Hasil penapisan fitokimia.....	48
Tabel V.2 Diameter Daerah Hambatan Aktivitas antimikroba ekstrak batang brotowali (<i>Tinospora crispa</i> L) dengan metode difusi cakram.....	49
Tabel V.3 Diameter Daerah Hambatan Aktivitas antimikroba ekstrak batang brotowali (<i>Tinospora crispa</i> L) dengan metode difusi cakram.....	50
Tabel V.4 Diameter Daerah Hambatan Aktivitas antimikroba ekstrak batang brotowali (<i>Tinospora crispa</i> L) dengan metode difusi cakram.....	51
Tabel V.5 Diameter Daerah Hambatan Aktivitas antimikroba ekstrak batang brotowali (<i>Tinospora crispa</i> L) dengan metode difusi cakram.....	52
Tabel V.6 Hasil Identifikasi Kromatogram dengan GCMS Ekstrak Fase <i>n</i> -heksan Batang Brotowali.....	54

BAB I

PENDAHULUAN

1. Latar Belakang

Tanaman obat sebagai obat asli Indonesia, sudah ada sejak zaman nenek moyang kita (Nusantara) yaitu digunakan dalam upaya memelihara kesehatan dan mengobati penyakit, kemudian pengetahuan ini diwariskan secara turun temurun dari generasi ke generasi, pengetahuan tentang tanaman obat dari luar seperti india, China terdapat kemiripan dikarenakan letak geografis Nusantara di antara dua pusat kebudayaan yaitu China dan India. Hubungan dagang dan penyebaran agama menjadi media penyaluran pengetahuan tentang tanaman obat. Sejak zaman kerajaan di Nusantara dari mulai Kutai Kartanegara, Sriwijaya, Majapahit sampai pada Kesultanan Mataram dan zaman VOC obat yang digunakan nenek moyang bangsa kita adalah tanaman obat. Pelajaran tentang obat modern di Indonesia berawal ketika didirikan Sekolah Dokter Djawa (STOVIA) tahun 1904 di Batavia oleh Pemerintah Hindia Belanda untuk memenuhi kebutuhan tenaga dokter dilingkungan mereka, pada zaman itu dimulai pelajaran tentang obat-obatan moderen dengan pendekatan kimiawi, sehingga pada saat itu pengobatan tradisional mulai sedikit terlupakan. (1)

Brotowali merupakan tumbuhan yang tumbuh liar di hutan, ladang atau kita juga bisa menanamnya. Brotowali sangat suka pada tempat yang panas, tumbuhan ini termasuk perdu dan memanjat. Memiliki tinggi batang hingga 2,5 m dengan besar batang sebesar jari kelingking, berbintil-bintil rapat dan memiliki rasa yang pahit. Tumbuhan ini juga merupakan tumbuhan daun tunggal, bertangkai, dengan bentuk daun seperti jantung atau agak mirip seperti bundar telur berujung lancip, dengan panjang daun 7-12 cm dan lebar 5-10 cm. Bunganya berukuran kecil, dengan warna hijau muda dengan bentuk tandan semu. Tumbuhan ini juga dapat diperbanyak dengan cara stek.

Brotowali tanaman liar yang baik untuk menyembuhkan berbagai macam penyakit. Daunnya sangat dikenal karena rasanya pahit. Berbagai macam penyakit seperti kudis, gatal-gatal, hepatitis, diabetes, rematik, malaria dapat disembuhkan dengan daun brotowali. Bahkan kanker yang mematikan sembuh berkat brotowali.

Penggunaan obat tradisional merupakan suatu cara pengobatan yang bersifat empiris tanpa dibuktikan secara ilmiah. Namun dalam fasilitas pelayanan kesehatan formal di Indonesia seperti di rumah sakit, klinik dan puskesmas digunakan obat dan cara penggunaan yang harus terlebih dahulu dibuktikan keamanan dan manfaatnya secara ilmiah, penelitian obat tradisional khususnya terhadap tanaman obat terus berlangsung bahkan meningkat akhir-akhir ini. Meskipun demikian masih sedikit hasil penelitian obat tradisional ataupun tanaman obat yang digunakan pada fasilitas pelayanan formal. Penelitian yang berkesinambungan dapat menjadi sumber informasi dalam rangka menerapkan pengobatan herbal berdasarkan bukti ilmiah (*Evidence Base Medicine*) salah satu khasiat tanaman yang digunakan sebagai anti bakteri untuk pengobatan infeksi sebagai obat tradisional dan sangat baik karena memiliki efek samping dan toksisitas yang kecil, di samping itu mudah diperoleh dan harganya relatif murah. Beberapa bakteri yang dapat menyebabkan penyakit infeksi diantaranya adalah *staphylococcus aureus*, *Bacillus substilis*, *Candida albicans* .Bakteri dapat menyebabkan infeksi secara lokal ataupun sistemik. Secara umum penyakit infeksi dapat disembuhkan dengan menggunakan antibiotik. Penggunaan antibiotik untuk infeksi lokal telah dikurangi karena kecenderungan menimbulkan hipersensitivitas secara lokal pada kulit atau membran mukosa. Salah satu tanaman yang dapat digunakan sebagai obat infeksi kulit seperti bisul adalah Batang Brotowali (*Tinospora crispa L*) pada berbagai literatur disebutkan bahwa tanaman brotowali, khususnya bagian batang dapat digunakan untuk pengobatan berbagai penyakit infeksi. Tanaman ini diketahui mengandung saponin, tanin, alkaloid, glikosida dan berberin.

Flavonoid merupakan golongan senyawa fenol alam. Fenol diduga dapat berfungsi sebagai antimikroba karena mendenaturasi protein dan merusak membransel, sedangkan mekanisme penghambatan saponin terhadap mikroba belum diketahui secara jelas. Berdasarkan hal tersebut maka akan dilakukan penelitian mengenai aktivitas antimikroba ekstrak Batang Brotowali (*Tinospora crispa L*) secara in vitro dengan harapan dapat membuktikan kebenaran informasi tentang aktifitas antimikroba ekstrak Batang Brotowali (*Tinospora crispa L*)

terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, *Bacillus substillis* dan *Candida albicans* dengan metode difusi cakram serta menentukan kesetaraan zat uji dengan antibiotik pembanding dan menguji bercak noda dari senyawa kimia aktif sebagai antimikroba yang diuji dengan cara bioautografi (2) yaitu dengan menempelkan langsung kromatogram yang berisi ekstrak uji pada media yang terinokulasi dengan mikroba uji.

Dalam usaha memperoleh zat aktif yang terkandung dalam suatu simplisia, dilakukan proses ekstraksi terhadap bahan tersebut. Ekstraksi merupakan suatu proses pemisahan suatu zat dari bahan padat maupun cair dengan bantuan pelarut (3). Pelarut yang digunakan harus dapat mengekstraksi zat yang diinginkan tanpa melarutkan senyawa lainnya sehingga zat aktif yang diinginkan dapat terekstraksi dengan sempurna. Ekstraksi menggunakan pelarut didasarkan pada kelarutan komponen terhadap komponen lain dalam campuran. Pemilihan metode ekstraksi merupakan hal yang penting untuk mendapatkan zat aktif dari suatu bahan. Salah satu metode ekstraksi adalah Sokletasi. Keuntungan sokletasi adalah dapat digunakan untuk penyarian pada temperatur tinggi, pelarut yang digunakan relatif sedikit, cocok untuk menyari zat dalam jumlah kecil pada simplisia. Kerugian dari metode sokletasi adalah menggunakan peralatan khusus, biaya mahal.

2. Perumusan Masalah

1. Apakah ekstrak etanol, fase *n* - heksan dan fase etil astetat Batang Brotowali (*Tinospora Crispa L*) memiliki aktivitas antimikroba terhadap *staphylococcus aureus*, *Bacillus substillis* dan *Candida albicans*.
2. Apakah senyawa kimia aktif yang mempunyai aktivitas antimikroba dapat diidentifikasi dengan Kromatografi Gas – Spektrofotometri Massa (GCMS) dan spektrofotometri IR.

3. Tujuan Penelitian

1. Untuk memperoleh identitas senyawa yang mempunyai aktivitas antimikroba dalam ekstrak etanol, fase *n*-heksan, fase etil asetat, dan fase air batang

brotowali terhadap bakteri *staphylococcus aureus*, *Bacillus substillis* dan *Candida albicans*, menggunakan metode Bioautografi..

2. Untuk mengevaluasi bercak komponen aktif yang memiliki aktifitas sebagai antimikroba dengan spektrofotometri IR dan Kromatografi Gas – Spektrometri Massa (GCMS)

4. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai :

1. Antimikroba dalam fase *n*- heksan batang brotowali terhadap bakteri *staphylococcus aureus*, *Bacillus substillis* dan *Candida albicans*.
2. Pemanfaatan tanaman obat tersebut untuk obat tradisional sebagai pengganti antibiotik.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Uraian Tanaman

1. Klasifikasi tanaman (5,6)

Kingdom	: Plantae (Tumbuhan)
Subkingdom	: Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
Super Divisi	: Spermatophyta (Menghasilkan Biji)
Divisi	: Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
Kelas	: Magnoliopsida (berkeping dua / dikotil)
Sub Kelas	: Magnoliidae
Ordo	: Ranunculales
Famili	: Menispermaceae
Genus	: <i>Tinospora</i>
Spesies	: <i>Tinospora crispa</i> L

2. Sinonim

Tinospora rumphii Boerl

Tinospora tuberculata (Lamk) Beaumae ex Heyne

3. Nama Umum

Indonesia : Brotowali, Bratawali; Melayu : Putar wali; Sunda : Andawali,
Bali : Antawali; China : Shen jin teng

4. Deskripsi

Brotowali merupakan tumbuhan merambat dengan panjang mencapai 2,5 m atau lebih, biasa tumbuh liar di hutan, ladang atau ditanam di halaman dekat pagar dan biasanya ditanam sebagai tumbuhan obat, batang sebesar jari kelingking, berbintil- bintil rapat, dan rasanya pahit, kulit-batangnya mengandung zat-zat seperti alkaloida dan damar lunak berwarna kuning sedang akarnya mengandung zat berberin dan kolumbin, daun tunggal, bertangkai dan berbentuk seperti jantung atau agak membulat, berujung lancip dengan panjang 7-12 cm dan lebar 5-10 cm, bunga kecil, berwarna hijau muda atau putih kehijauan brotowali menyebar merata hampir diseluruh wilayah Indonesia dan beberapa negara lain di Asia Tenggara dan India brotowali tumbuh baik di hutan terbuka atau semak belukar di daerah tropis, cara perbanyak tanaman ini sangat mudah yaitu dengan stek batang.

5. Asal dan Habitat

Tumbuhan ini berasal dari Asia Tenggara, misalnya di Indo Cina, Semenanjung Melayu, Filipina dan Indonesia (Jawa, Bali, Ambon). Tumbuh liar di hutan dan di ladang.

6. Bagian tanaman yang digunakan

Pemanfaatan dari tanaman Bratawali ini banyak terdapat pada bagian batang tanaman. Biasanya bagian batang tanaman perlu direbus dahulu kemudian air rebusan batang bratawali dipakai untuk mencuci luka, kulit-batangnya mengandung zat-zat seperti alkaloid dan damar lunak berwarna kuning sedang akarnya mengandung zat berberin dan kolumbin. Kandungan alkaloid berberina berguna untuk membunuh bakteri pada luka. Zat pahit pikroretin dapat merangsang kerja urat saraf sehingga alat pernapasan bekerja dengan baik dan menggiatkan pertukaran zat sehingga dapat menurunkan panas. Selain sebagai obat, bratawali juga berfungsi sebagai penambah nafsu makan dan menurunkan kadar gula dalam darah, sebagaimana penemuan pada abad ke-20. Sebagai obat, bratawali biasa direbus dan diminum ataupun dioleskan

pada kulit untuk luka luar. Penyakit-penyakit yang dapat diobati dengan menggunakan bratawali ialah rheumatic arthritis, rheumatik sendi, demam, demam kuning, kencing manis, malaria, diabetes, serta penyakit luar seperti memar, kudis, dan luka, di Indo-Cina semua bagian tumbuh-tumbuhan dari bratawali dipakai sebagai obat demam yang dapat menggantikan kinine. Di Filipina, bratawali dianggap sebagai obat serba bisa yang dapat dipakai untuk mengobati penyakit gila, dan berkhasiat seperti kina. Di Bali batangnya dipakai sebagai obat sakit perut, demam dan sakit kuning, bahkan sebagai obat gosok untuk mengobati sakit punggung dan pinggang. Sedangkan, di Jawa, air rebusannya dapat digunakan untuk mengobati demam, obat luar untuk luka, dan gatal-gatal. Pada beberapa penyelidikan, ternyata air rebusan batang bratawali dapat memberi ketenangan pada tikus, dengan demikian pemakaiannya bermanfaat dalam menangani penyakit kesadaran (psychosis). Ia juga membuat tikus memiliki sekresi yang lebih banyak.

7. Kandungan kimia, batang brotowali (1)

Senyawa alkaloid palmatin, bebrin, jatrorrhizin, tembetarin, kolin, N-trans-feruloi-triamin, N-cis-feruloiltiramin, N-formilanonain, N-formilnornusiferin, N-acetilnor-nusiferin; senyawa terpenoid kolumbin A-B borapetosid, tinokrisposid, tinotuberid, borapetol, siringin, sekoisolarisiresinol, tinotufolin, tinotufolin C-F, galaktan, metilpentosan, pikroretin, sikloeukalenol, sikloeukalenon, pikroretosid dan senyawa flavonoid apigenin.

B. Ekstraksi

1. Simplisia

Simplisia adalah bahan alamiah yang dipergunakan sebagai obat yang belum mengalami pengolahan apapun juga dan kecuali dinyatakan lain, berupa bahan yang telah dikeringkan. Ada tiga macam simplisia, yaitu simplisia nabati atau simplisia hewani, dan simplisia mineral.

2. Ekstrak

Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau semua pelarut diuapkan dan masa atau serbuk yang tersisa diperlukan sedemikian sehingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (1, 7) ekstrak berdasarkan sifatnya dapat dikelompokkan menjadi tiga, yaitu : ekstrak encer, (*extractum tenue*), sediaan ini mempunyai konsistensi seperti madu dapat dituang, ekstrak kental (*extractum spissum*), sediaan ini liat dalam keadaan dingin dan tidak dapat dituang, kandungan airnya sampai 30%, ekstrak kering (*extractum siccum*), sediaan ini memiliki konsistensi kering dan mudah digosokan, melalui penguapan pelarut dan sisanya menjadi produk. Dan sebaiknya kandungan lembab tidak lebih dari 5%.(8)

3. Ekstraksi

Ekstraksi adalah kegiatan penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak larut dalam pelarut cair. Simplisia yang diekstraksi mengandung senyawa aktif yang larut dan senyawa yang tidak larut seperti serat, karbohidrat, protein dan lain-lain, Senyawa aktif yang terdapat dalam berbagai simplisia dapat dimasukkan ke dalam golongan minyak atsiri. Saporin, flavonoid, alkaloid dan lain-lain, pemilihan pelarut tergantung pada sifat dan zat yang di ekstraksi dan dengan mengetahui senyawa aktif yang dikandung simplisia akan mempermudah pemilihan pelarut.

4. Proses pembuatan ekstrak

a. Pembuatan serbuk simplisia

Proses awal pembuatan ekstrak adalah tahapan pembuatan serbuk simplisia kering (penyerbukan), simplisia dibuat serbuk dengan menggunakan peralatan tertentu sampai mendapatkan derajat kehalusan tertentu.(8)

b. Cairan pelarut

Cairan pelarut dalam pembuatan ekstrak adalah pelarut yang baik untuk senyawa kandungan yang berkhasiat atau yang aktif, dengan demikian senyawa tersebut dapat terpisahkan dari bahan dan dari senyawa kandungan lainnya, serta ekstrak hanya mengandung sebagian besar senyawa kandungan yang diinginkan. Dalam hal ekstrak total, maka cairan pelarut dipilih yang dapat melarutkan hampir semua metabolit sekunder. Faktor utama untuk pertimbangan pada pemilihan cairan penyari adalah selektivitas ekonomis, keamanan, ramah lingkungan dan kemudahan bekerja.

c. Separasi dan pemurnian

Separasi dan pemurnian adalah tahapan menghilangkan (memisahkan) senyawa yang tidak dikehendaki semaksimal mungkin tanpa berpengaruh pada senyawa yang dikehendaki, sehingga diperoleh ekstrak yang lebih murni. (7, 8)

d. Pemekatan/Penguapan

Pemekatan berarti peningkatan jumlah senyawa terlarut secara penguapan pelarut tanpa sampai menjadi kondisi kering, ekstrak hanya menjadi kental atau pekat.(7, 8)

e. Pengeringan ekstrak

Pengeringan berarti menghilangkan pelarut dari bahan sehingga menghasilkan serbuk, masa kering – rapuh tergantung proses dan peralatan yang digunakan.(7, 8)

5. Metode ekstraksi

a. Maserasi (7)

Maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan menggunakan beberapakali pengocokan atau pengadukan

pada temperature ruangan (kamar), secara teknologi termasuk ekstraks dengan prinsip metode pencapaian konsentrasi pada kesimbangan. Maserasi kinetika berarti dilakukan pengadukan yang kontinue (terus-menerus) remaserasi berarti dilakukan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan masersit pertama, dan seterusnya.

b. Perkolasi (1, 7)

Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai sempurna yang umum dilakukan pada suhu ruangan. Proses terdiri dari tahapan pengembangan bahan, tahap maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya (penetasan/penampungan ekstrak), terus menerus sampai diperoleh ekstrak (perkolat) yang jumlahnya 1 – 5 kali bahan.

c. Sokhletasi (1, 7)

Sokhletasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi secara terus menerus dengan jumlah pelarut yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik.

d. Refluks (7, 9)

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

e. Digesti (7, 9)

Digesti adalah ekstraksi kinetik (dengan pengadukan kontinue) pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur ruangan (kamaaitu secara umum dilakukan pada temperatur 40 – 50⁰C).

f. Infus (7, 9)

Infus adalah ekstraksi dengan pelarut air pada temperatur penangas air (bejana infus tercelup dalam penanga air mendidih, temperatur terukur 96 – 98⁰C) selama waktu tertentu (15 – 20 menit).

g. Dekok (7, 9)

Dekok adalah infus pada waktu yang lebih lama ($\geq 30^{\circ}\text{C}$) dan temperatur sampai titik didih air.

C. PARTISI

Partisi merupakan proses pemisahan kandungan berdasarkan perbedaan kepolaran dari kandungan kimia masing – masing. Tujuan partisi adalah untuk memisahkan golongan utama kandungan yang satu dari golongan utama lainnya. Jumlah dan jenis senyawa yang didapat dipisahkan menjadi beberapa fase, tergantung pada jenis tumbuhannya (Harbone, 1996)

D. PENAPISAN FITOKIMIA (10, 11, 12)

Setiap tanaman obat mengandung beragam senyawa organik yang terbentuk dalam tanaman tersebut. Kandungan senyawa aktif yang terdapat dalam tumbuhan dapat diketahui melalui perlakuan metode pemisahan, pemurnian dan identifikasi kandungan didalam tanaman dengan penapisan fitokimia (Harbone 1987). Kandungan senyawa organik yang umum diidentifikasi adalah alkaloid, tanin, saponin, steroid, terpenoid flavonoid, dan minyak atsiri. Penapisan fitokimia dilakukan menurut metode *fansworth* terhadap serbuk batang brotowali, ekstrak etanol, ekstrak n heksan dan ekstrak etil asetat untuk mengidentifikasi golongan senyawa kimia yang terkandung didalam bahan yang digunakan:

1. Flavonoid (13, 14)

Flavonoid merupakan suatu kelompok senyawa fenol yang banyak terdapat dalam tumbuhan terikat pada gula sebagai glikosida dan aglikon. Senyawa – senyawa ini merupakan zat warna merah, ungu dan biru sebagian zat warna kuning yang ditemukan didalam tumbuh-tumbuhan. Flavonoid mempunyai kerangka dasar karbon yang terdiri dari 15 atom karbon dalam inti dasarnya yang tersusun dalam konfigurasi C6 – C3 – C6, yaitu cincin aromatik yang dihubungkan oleh satuan tiga karbon yang dapat atau tidak dapat membentuk cincin ketiga. Berdasarkan struktur kimianya flavonoid dikategorikan menjadi flavonol, flavon, flavonon,

isoflavon, katekin, antosianidin, dan kalkon. Flavonoid mempunyai gugus hidroksil dan umumnya bersifat larut dalam air atau dapat di ekstraksi dengan pelarut polar seperti methanol, etanol atau aseton. Flavonoid mengandung sistim aromatik terkonjugasi dan menunjukkan pita serapan kuat pada daerah spektrum UV dan spektrum tampak.

2. **Fenol** (C₆H₅OH) (15)

Senyawa fenol adalah senyawa yang mempunyai satu atau lebih cincin aromatik dengan satu atau lebih gugus hidroksil, mudah larut dalam air umumnya berikatan dengan gula sebagai glukosida dan dikelompokkan sebagai asam fenolat, flavonoid, stiben, kumarin dan tanin. Flavonoid merupakan golongan terbesar dalam senyawa fenol, dalam tanaman semua senyawa fenol merupakan hasil metabolit sekunder tumbuhan yang berasal dari satu jalur biosintesa dengan prekursor jalur skimat dan asetat – malonat. Fenol bersifat asam karena mudah melepaskan diri karena itu senyawa ini di sintesa untuk merespon serangan patogen seperti: jamur, bakteri.

3. **Alkaloid**

Alkaloid adalah senyawa organik yang terdapat di alam bersifat basa atau alkali dan sifat basa ini disebabkan karena adanya atom N (Nitrogen) dalam molekul senyawa tersebut dalam struktur lingkaran heterosiklik atau aromatis, dan dalam dosis kecil dapat memberikan efek farmakologis pada manusia dan hewan. Alkaloid juga adalah suatu golongan senyawa organik yang terbanyak ditemukan di alam. Hampir seluruh senyawa alkaloida berasal dari tumbuh-tumbuhan dan tersebar luas dalam berbagai jenis tumbuhan. Semua alkaloida mengandung paling sedikit satu atom nitrogen.

Hampir semua alkaloida yang ditemukan di alam mempunyai keaktifan biologis tertentu, ada yang sangat beracun tetapi ada pula yang sangat berguna dalam pengobatan. Misalnya kuinin, morfin dan stiknin adalah

alkaloida yang terkenal dan mempunyai efek fisiologis dan psikologis. Alkaloida dapat ditemukan dalam berbagai bagian tumbuhan seperti biji, daun, ranting dan kulit batang. Alkaloida umumnya ditemukan dalam kadar yang kecil dan harus dipisahkan dari campuran senyawa yang rumit yang berasal dari jaringan tumbuhan.

4. Terpenoid

Dalam tumbuhan biasanya terdapat senyawa hidrokarbon dan hidrokarbon teroksigenasi yang merupakan senyawa terpenoid. Kata terpenoid mencakup sejumlah besar senyawa tumbuhan, dan istilah ini digunakan untuk menunjukkan bahwa secara biosintesis semua senyawa tumbuhan itu berasal dari senyawa yang sama. Jadi, semua terpenoid berasal dari molekul isoprene $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$ dan kerangka karbonnya dibangun oleh penyambungan 2 atau lebih satuan C₅ ini. Kemudian senyawa itu dipilah-pilah menjadi beberapa golongan berdasarkan jumlah satuan yang terdapat dalam senyawa tersebut, 2 (C₁₀), 3 (C₁₅), 4 (C₂₀), 6 (C₃₀) atau 8 (C₄₀). Terpenoid terdiri atas beberapa macam senyawa, mulai dari komponen minyak atsiri, yaitu monoterpena dan sesquiterpena yang mudah menguap (C₁₀ dan C₁₅), diterpena menguap, yaitu triterpenoid dan sterol (C₃₀), serta pigmen karotenoid (C₄₀). Masing-masing golongan terpenoid itu penting, baik dalam pertumbuhan dan metabolisme maupun pada ekologi tumbuhan. Terpenoid merupakan unit isoprena (C₅H₈). Terpenoid merupakan senyawa yang kerangka karbonnya berasal dari enam satuan isoprena dan secara biosintesis diturunkan dari hidrokarbon C₃₀ siklik yaitu skualena. Senyawa ini berstruktur siklik yang nisbi rumit, kebanyakan berupa alkohol, aldehid atau atom karboksilat. Mereka berupa senyawa berwarna, berbentuk kristal, seringkali bertitik leleh tinggi dan aktif optik yang umumnya sukar dicirikan karena tak ada kereaktifan kimianya.

E. ANTIMIKROBA (16, 17)

Antimikroba adalah zat yang digunakan untuk membasmi mikroorganisme khususnya yang merugikan manusia. Obat yang digunakan untuk membasmi bakteri penyebab infeksi pada manusia harus memiliki sifat toksisitas selektif setinggi mungkin, artinya obat tersebut harus bersifat sangat toksik untuk bakteri, tetapi relatif tidak toksik untuk hospes. Berdasarkan aktivitasnya, zat antimikroba dibedakan menjadi 2 jenis, yaitu antimikroba yang memiliki aktivitas menghambat pertumbuhan bakteri, disebut bakteristatik dan yang memiliki aktivitas membunuh bakteri, disebut bakterisida.

1) Pengujian Daya Antimikroba (17, 18)

Aktivitas antimikroba diukur *in vitro* untuk menentukan:

- a. Potensi zat antibakteri dalam larutan
- b. Konsentrasinya dalam cairan tubuh dan jaringan
- c. Kepekaan mikroorganisme terhadap zat antibakteri pada konsentrasi tertentu.

2) Faktor yang mempengaruhi aktivitas antimikroba secara invitro

- a. pH lingkungan (konsentrasi ion hidrogen)

Beberapa obat lebih peka aktif pada pH asam (misalnya Nitrofurantoin) sedangkan yang lain pada pH basa (misalnya Sulfonilamid dan Aminoglikosida).

- b. Komponen – komponen perbenihan

Natrium polianetol sulfonat dan detergent anion lain menghambat aminoglikosida. PABA dalam ekstrak jaringan menjadi antagonis sulfonamida. Protein serum mengikat penisilin berbagai tingkatan, berkisar dari 40 % untuk metisilin sampai 98 % untuk diklosasilin. Penambahan NaCl pada perbenihan meningkatkan pendeteksian resistensi metisilin pada *staphylococcus aureus*.

- c. Stabilitas obat

Pada suhu pengeringan, beberapa obat antimikroba kehilangan daya kerjanya. Klortetrasiklin lebih cepat dibuat tidak aktif dan penisilin lebih

lambat, sedangkan aminoglikosida, kloramfenikol, dan siprofloksasin tetap stabil untuk waktu yang lama.

d. **Besarnya inokulum**

Pada umumnya, makin besar inokulum bakteri, makin rendah kepekaan organism. Populasi bakteri yang lebih besar lebih lambat dan kurang lengkap hambatannya daripada populasi yang kecil, disamping itu kemungkinan timbulnya mutan yang resisten lebih sering daripada populasi besar.

e. **Masa pengeraman**

Dalam banyak hal mikroorganisme tidak dimatikan tetapi hanya dihambat setelah berhubungan singkat dengan zat antimikroba. Makin lama masa pengeraman berlangsung, makin besar kemungkinan timbulnya mutan resisten, semakin besar juga kemungkinan mikroorganisme kurang peka untuk memulai berkembang biak sementara kekuatan obat berkurang.

f. **Aktivitas metabolik mikroorganisme**

Umumnya, mikroorganisme yang aktif dan tumbuh cepat lebih peka terhadap daya kerja obat daripada mikroorganisme yang berada dalam keadaan istirahat. Mikroorganisme yang metabolisnya tidak aktif dan dapat bertahan lama terhadap pengaruh obat mungkin memiliki turunan yang sangat peka terhadap obat yang sama.

3) Faktor yang berpengaruh dalam pengujian aktivitas antimikroba diantaranya yaitu: (17)

- a. Mikroorganisme uji (jumlah inokulum yang digunakan, fisiologi sel, kultur media pertumbuhan, bahan antimikroba yang digunakan, interaksi komponen uji dengan komponen media, koefisien partisi).
- b. Media uji (pH, kadar air, potensial redoks).
- c. Prosedur uji (kondisi inkubasi, tekanan udara, konsentrasi atmosfer, suhu inkubasi, keragaman alat).

4) Pengujian aktifitas antimikroba (15, 19)

a. Uji Aktivitas Bakteri

Menurut IONI (2000), zat antimikroba diartikan sebagai obat pembasmi mikroba, khususnya yang merugikan manusia. Zat antimikroba terdiri dari anti jamur dan anti mikroba. Berdasarkan jangkauan aktvitasnya zat anti mikroba terdiri dari spectrum luas (*Broad spectrum*) dan spektrum sempit (*Narrow spectrum*). Zat antimikroba spektrum luas (*Broad spectrum*) adalah aktvitasnya bekerja baik jenis kuman gram positif dan gram negatif. Zat antimikroba yang aktif terhadap beberapa jenis kuman saja disebut *Narrow spectrum* (Tjya dan Raharja, 2007). Kekuatan suatu senyawa antimikroba dapat diketahui berdasarkan luasnya daerah hambat atau zona hambat yang berhubungan dengan konsentrasi dimana makin besar konsentrasi maka zona hambat makin besar.

b. Kategori kekuatan antimikroba (Sout dan Ardiansyah, 2005)

> 20 mm	: Sangat Kuat
10 – 20 mm	: Kuat
5 – 10 mm	: Sedang
< 5 mm	: Lemah

c. Penetapan diameter antimikroba dikelompokkan menjadi dua yaitu:

1) Metode pengenceran (*dilusi*)

Dibedakan menjadi 2 yaitu dilusi cair (*broth dilution*) dan dilusi padat (*solid dilution*).

a) Metode dilusi cair / *broth dilution test (serial dilution)*

Metode ini menggunakan antimikroba dengan kadar yang menurun secara bertahap, baik dengan media cair ataupun padat. Kemudian media diinokulasi bakteri uji deramkan. Tahap akhir dilarutkan antimikroba dengan kadar yang menghambat atau mematikan. Uji kepekaan cara dilusi agar memakan waktu dan penggunaannya dibatasi pada keadaan tertentu saja (Jawatzetal, 2001). Metode ini

mengukur MIC (*minimum inhibitory concentration*) atau kadar hambat minimum, (KHM) dan MBC (*minimum bactericidal concentration*) atau kadar bunuh minimum (KBM). Cara yang dilakukan adalah dengan membuat seri pengenceran agen mikroba pada medium cair yang ditambahkan dengan mikroba uji. Larutan yang ditetapkan sebagai KHM tersebut selanjutnya dikultur ulang pada media cair tanpa penambahan mikroba uji ataupun agen antimikroba dan diinkubasi pada suhu 35°C selama 1 – 24 jam. Media cair yang tetap jernih setelah inkubasi ditetapkan sebagai KBM.

b) Metode difusi

Prinsipnya zat yang akan diuji didifusikan dari pencadangan kedalam medium agar yang telah diinokulasi dengan mikroba uji – inkubasi selama waktu tertentu dan kemudian diamati adanya hambatan pertumbuhan mikroba uji. Diameter hambat yang terbentuk diukur dan dibandingkan dengan diameter baku standar. Metode ini dilakukan untuk menentukan aktivitas antimikroba yang berdifusi pada lempeng agar yang telah ditanami mikroba. Aktivitas suatu senyawa ditunjukkan dengan ada atau tidaknya zona hambatan penumbuhan mikroba. Keuntungan metode ini adalah satu konsentrasi agen antimikroba yang diuji digunakan untuk menguji beberapa mikroba uji.

Metode difusi dibedakan menjadi 3 bagian yaitu: (17, 19, 20)

1) Cara cakram (*Metode Kirby Bauner*)

Pada cara ini menggunakan kertas cakram (*paper disc*) dengan diameter 6 mm yang mengandung zat antibakteri, kemudian diletakan pada permukaan agar yang telah diinokulasi bakteri pada suhu 37° C selama 1 – 24 jam. Hasil pengamatan dilihat dari zona hambat di sekeliling cakram. Dengan menggunakan

cakram kertas ini jumlah larutan antibakteri yang diserap dapat diatur sesuai dengan kapasitas daya serap kertas. Juga tergantung pada diameter dan ketebalan pada cakram tersebut. Akan tetapi jika komposisi kertasnya kurang baik maka dapat berpengaruh terhadap difusi zat uji sehingga diameter hambatan yang terbentuk akan bervariasi.

2) Cara Silinder

Cara ini menggunakan tabung silinder dengan diameter 6 mm yang diletakkan pada permukaan agar yang telah diinokulasi dengan mikroba uji kemudian diisi larutan uji diinokubasi pada suhu 37° C selama 18 – 24 jam. Pengamatan ini dilihat ada tidaknya zona hambat di sekeliling tabung cetak lubang dapat dilakukan dengan melubangi medium agar yang telah diinokulasi dengan alat penghisap agar, keuntungannya yaitu jumlah antibakteri yang berdifusi dapat terukur jumlahnya dengan medium yang digunakan tidak begitu tebal namun bila cetak lubang kurang sempurna maka akan mempengaruhi difusi zat uji (Atmawijaya, 1948).

3) Cara Sumur (Well)

Cara ini dilakukan dengan membuat lubang pada media agar yang telah diinokulasi dengan mikroba. Pada permukaan agar dibuat lubang berdiameter 5 – 8 mm. Kemudian lubang yang terbentuk diisi dengan larutan yang mengandung zat antimikroba, diinokubasi pada suhu 37° C selama 18 – 24 jam. Pengamatan dilihat ada tidaknya zona hambat disekeliling sumur cara ini menggunakan media cair. Hambatan pertumbuhan mikroba uji diukur dengan menentukan kekeruhan larutan dengan suatu alat yang cocok misalnya spektrofotometer. Kepekaan mikroba terhadap antibiotik dapat

dilihat dari konsentrasi minimum inhibisi oleh suatu antibiotik terhadap mikroba tertentu (Atmawijaya, 1948).

5. Mikroba Uji (14, 21)

a. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus berasal dari kata staphyle yang berarti kelompok buah anggur dan kokus berarti bakteri yang memiliki morfologi berbentuk bulat seperti untaian anggur dan mempunyai diameter yang berkisar 0,75 – 1,25 μm . *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri Gram positif, tidak bergerak, tidak berspora tersusun dalam rangkaian tidak beraturan seperti anggur dan bersifat aerob atau anaerob fakultatif. Bakteri ini mudah tumbuh pada kebanyakan pembenihan, bakteri, memerlukan suhu optimal 30° - 37° C. *Staphylococcus aureus* adalah mikroorganisme yang biasanya terdapat diberbagai bagian tubuh manusia, termasuk hidung, tenggorokan, kulit dan karenanya mudah memasuki makanan. Keracunan makanan yang umumnya terjadi karena toksin yang dihasilkan oleh galur-galur toksigenik *Staphylococcus aureus* yang tumbuh pada makanan yang tercemar. Toksin ini dapat merusak usus yang mengakibatkan terganggunya proses penyerapan air dan elektrolit diusus sehingga menghasilkan diare disertai mual dan muntah.

b. *Bacillus substillis* (17)

Bacillus substillis merupakan bakteri Gram - positif yang berbentuk batang. Berbentuk spora oval atau silinder bersifat aerob fakultatif dari golongan *Bacillaceae* dan terbagi dalam dua genus yaitu genus *Bacillus* yang bersifat aerob dan genus *Clostridium* yang bersifat anaerob warnanya kekuningan dan merah muda dan secara alami sering ditemukan ditanah dan dapat menyebabkan meningitis, endokarditis, infeksi mata. *Bacillus substillis* tumbuh diberbagai suhu berkisar 25 - 35° C. Beberapa keunggulan dari bakteri ini adalah mampu mensekresikan antibiotik dalam jumlah besar keluar dari sel (Scetzer, 2006).

c. *Candida albicans* (22)

Candida albicans adalah suatu ragi lonjong, bertunas menghasilkan pseudo miselium baik dalam biakan maupun dalam jaringan dan eksudat, termasuk gram positif ukuran 2 – 3 pm x 4 – 6 pm dan sel – sel bertunas yang memanjang menyerupai hifa. *Candida albicans* merupakan spesies jamur yang secara normal dapat dalam ronggga mulut manusia. *Candida albicans* bersifat oportunistik patogen, yaitu tidak bersifat patogen pada individu sehat tetapi akan menjadi patogen pada individu dengan kondisi daya tahan tubuh yang lemah. Pada agar Saboroud yang di inkubasi pada suhu kamar, berbentuk koloni-koloni berwarna coklat mempunyai bau seperti ragi. *Candida albicans* dapat meragikan glukosa dan gula, menghasilkan asam dan gas, asam dari sukrosa dan tidak bereaksi dengan laktosa. *Candida albicans* merupakan anggota flora normal selaput lendir pernafasan, saluran pencernaan, dan genitalia wanita. Pada tempat-tempat ini jamur *Candida albicans* dapat menjadi dominan dan dihubungkan dengan keadaan patogen. Jamur ini dapat masuk ke dalam aliran darah dan menyebabkan trombofelitis, endokarditis, atau infeksi pada mata atau organ-organ lain bila dimasukkan kedalam intravena. *Candida albicans* dan ragi lainnya dapat diperoleh dari sumber endogen. Konidia dari jamur lain sering kali ditemukan di udara.

6. **Antibiotik sebagai antimikroba** (17, 20)

Antibiotik adalah zat yang dihasilkan oleh suatu mikroba, terutama fungi, yang dapat menghambat mikroba jenis lain. Obat yang digunakan untuk membasmi mikroba penyebab infeksi pada manusia harus memiliki sifat toksisitas selektif setinggi mungkin, artinya obat tersebut haruslah bersifat sangat toksik untuk mikroba, tetapi relatif tidak toksik untuk hospes. Sifat toksisitas selektif absolute belum atau mungkin tidak akan diperoleh:

a. **Berdasarkan aktivitasnya antibiotik dibagi menjadi 2 golongan, yaitu**

:

Antibiotik spektrum kerja luas (*Broad Spectrum*), yaitu antibiotik yang dapat mematikan bakteri gram positif dan negatif yang termasuk antibiotik broad spektrum ialah : Tetraskilin, kloramfenikol, Ampisilin, Sulfonamid, Sefalosporin. Antibiotik spektrum kerja sempit (*Narrow Spectrum*), yaitu antibiotik yang hanya memiliki aktivitas terhadap beberapa jenis bakteri saja, yang termasuk golongan ini adalah : penisilin G, Streptomisin, Neomisin, Basitrasin.

b. Mekanisme kerja antibiotik dibagi menjadi 5 kelompok yaitu :

- 1) Antibiotik yang menghambat metabolisme sel bakteri penghambatan terhadap sintesis metabolit esensial antara lain dengan adanya kompetitor berupa antimetabolit. Yang termasuk dalam kelompok ini adalah sulfonamide, trimetropin, asam p – aminosalisilat (PAS) mekanisme kerja ini diperoleh efek bakteristatik
- 2) Antibiotik yang menghambat sintesis dinding sel bakteri, dinding sel bakteri terdiri dari polipeptida glikan, obat yang termasuk dalam kelompok ini ialah penisilin, sefalosporin, basitrasin, vankomisin, dan sikloserin.
- 3) Antibiotik yang merusak membran plasma sel bakteri : membran plasma bersifat semi permeabel dan mengendalikan transport berbagai metabolit ke dalam dan keluar. Gol antibiotik yang termasuk dalam kelompok ini ialah : polimiksin, golongan polien, serta berbagai antimikroba kemoterapeutik. Polomiksin sebagai senyawa ammonium-kuarterner dapat merusak membran sel setelah bereaksi dengan fosfat pada fosfolipid membran sel mikroba.
- 4) Antibiotik yang menghambat sintesis protein sel bakteri merupakan golongan antibiotik yang gol aminonya tergabung dalam katan glikosida. Obat yang termasuk dalam kelompok ini ialah golongan aminoglikosida makrolit, linkomisin, tetraskilin dan kloramfenikol.
- 5) Antibiotik yang menghambat sintesis asam nukleat sel bakteri Penghambatan pada asam nukleat berupa penghambatan terhadap

transkripsi dan replikasi mikrom organism. Contoh: gol quinolon dan rifampisin.

c. **Resistensi terhadap suatu antibiotik melalui 3 mekanisme :**

- 1) Obat tidak dapat mencapai tempat kerjanya didalam sel mikroba.
- 2) Inaktivasi obat
- 3) Mikroba mengubah tempat ikatan (binding site) antibiotik.

d. **Efek samping pemakaian antibiotik (17)**

- 1) Reaksi alergi : reaksi alergi dapat ditimbulkan oleh semua antibiotik dengan melibatkan system imun tubuh hospes terjadinya tidak bergantung pada besarnya dosis obat, manifestasi gejala dan derajat beratnya reaksi dapat bervariasi.
- 2) Reaksi Idiosinkrasi : gejala ini merupakan reaksi abnormal yang diturunkan secara genetik terhadap pemberian antimikroba tertentu. Sebagai contoh 10% pada kulit hitam akan mengalami anemia liemolitik berat bila mendapat primakulin. Ini disebabkan mereka kekurangan enzim G6PD.
- 3) Reaksi Toksik : antibiotika pada umumnya bersifat toksik – selektif, tetapi sifat ini relatif toksik pada hospes yang ditimbulkan oleh semua jenis antimikroba.
- 4) Perubahan metabolik dan biologik : pada tubuh hospes, baik yang sehat maupun yang menderita infeksi, terdapat populasi mikroflora normal.

7. **Antibiotik Pemanding (17, 23)**

Streptomisin

Streptomisin adalah antibiotik (*antimycobacterial*) dari kelas aminoglikosida yang ditemukan pada tahun 1940 dihasilkan dari *streptomyces griseus* yang menghambat sintesa protein pada bakteri dan bersifat bakterisida terhadap bakteri gram positif dan bakteri gram negatif yang peka. Efektivitas

terapeutik streptomisin terbatas karena timbul muatan resisten dengan cepat. Semua strain bakteri menghasilkan muatan kromosom yang resisten, streptomisin dengan frekwensi yang relative tinggi. Muatan kromosom mengalami perubahan pada reseptor P12 pada ribosom sub unit 30 S. sehingga sintesis protein terganggu resistensi yang ditimbulkan oleh plasmid – perantara menyebabkan kerusakan obat oleh enzim

8. Kromatografi (24, 25)

Kromatografi pertama kali dikembangkan oleh ahli botani Rusia Michael Tswett pada tahun 1903 untuk memisahkan pigmen berwarna dalam tanaman dengan cara perkolasi ekstrak, bentuk kromatografi yang paling awal adalah kromatografi kolom yang digunakan untuk pemisahan zat terlarut oleh suatu proses migrasi diferensial dinamis dalam system yang terdiri dari dua fase atau lebih, salah satu diantaranya bergerak secara berkesinambungan dalam arah tertentu dan didalamnya zat – zat terlarut menunjukkan perbedaan mobilitas yang disebabkan adanya perbedaan dalam adsorpsi, partisi, kelarutan, tekanan uap, ukuran molekul atau kerapatan muatan ion.

Dengan demikian masing-masing zat dapat didefinisikan atau ditetapkan dengan metode analitik, teknik kromatografi umum membutuhkan zat terlarut yang terdistribusi diantara dua fase, satu diantaranya (fase diam), yang lain nya bergerak (fase gerak). Fase gerak membawa zat terlarut melalui media, hingga terpisah dari zat terlarut lainnya, yang tereluasi lebih awal atau lebih akhir. Umumnya zat terlarut dibawa melewati media pemisah oleh aliran suatu pelarut berbentuk cairan atau gas yang disebut eluen. Fase diam dapat bertindak zat penjerap seperti halnya penjerap alumina yang diaktifkan, silika gel, dan resin penukar ion atau dapat bertindak melarutkan zat terlarut sehingga terjadi partisi antara fase diam dan fase gerak.

Dalam proses terakhir ini, suatu lapisan cairan pada suatu penyanggah yang inert berfungsi sebagai fase diam. Proses pemisahan dan pemurnian dapat dilakukan dengan menggunakan salah satu dari teknik kromatografi seperti kromatografi kertas (KKt), kromatografi lapis tipis (KLT), kromatografi gas

cair (KGC), dan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Semua teknik tersebut dapat digunakan pada skala mikro maupun makro. KLT dilakukan pada lapisan penjerap yang tebal dan KKT pada lembaran kertas saring yang tebal. Untuk isolasi pada skala yang lebih besar, biasanya digunakan kromatografi kolom yang digabungkan dengan pengumpulan fase otomatis.

Metode kromatografi yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

a. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi Lapis Tipis adalah suatu cara pemisahan campuran zat menggunakan sebuah lapisan tipis bahan penyerap, berdasarkan prinsip adsorpsi dan partisi, campuran yang akan dipisahkan dari suatu zat ditotolkan berupa bercak atau pita pada salah satu ujung penyerap rapat yang berisi cairan pengembang (fase gerak) kemudian dengan bantuan cairan rambatan digerakkan keujung lain sampai batas tertentu, batas ini disebut batas rambat.

Istilah – istilah dalam kromatografi Lapis Tipis:

- 1) Bahan penyerap (fase diam)
Bahan penyerap disebut juga fase diam atau stationer. Penyerap yang umum adalah silica gel, aluminium oksida, selulosa dan turunannya.
- 2) Cairan rambat (fase gerak) merupakan suatu campuran yang terdiri dari satu atau beberapa campuran pelarut, berupa zat organik yang mudah menguap disebut fase gerak karena ia merambat perlahan lahan dari ujung lempeng menuju ujung lain karena ada gaya kapiler.
- 3) Jarak rambat adalah mulai dari titik penotolan sampai batas cairan merambat.
- 4) Cara mendeteksi dilakukan sebelum atau sesudah disemprot dengan larutan pereaksi dengan sinar biasa dan sinar UV 254 dan 366 nm.
- 5) Jarak bercak adalah jarak antara titik penotolan dengan sesuatu bercak dibandingkan dengan jarak rambat jarak ini disingkat dengan Rf harga Rf tertinggi adalah 1,00 untuk memudahkan penulisannya lebih disukai pemakaian 100 kalinya dan diperoleh hRf.

R_f = Jarak titik pusat bercak dari titik awal / jarak garis depan dari titik awal

hR_f = $R_f \times 100$

b. Kromatografi Gas – Spektrometri Massa (24, 25, 27)

Instrumen analitik yang dikembangkan dalam spektrometer massa adalah gabungan dari kromatografi gas dan spektrometer massa. Gabungan instrument ini bekerja dengan menggabungkan kedua teknik alat tersebut, yaitu antara waktu retensi dan data spektrum massa. Gabungan ini biasanya disebut sebagai kromatografi gas – spektrometri massa (GCMS). Data kromatograf gas terdiri atas waktu retensi berbagai komponen senyawa, dimana semakin besar massa suatu senyawa maka waktu retensi yang dihasilkan akan lebih lama. Sedangkan spektrometri massa bekerja dengan memisahkan senyawa dengan massa yang berbeda berdasarkan pada pemberian energi yang sama kepada semua senyawa sehingga membentuk fragmen – fragmen, yang jika digabungkan menjadi sebuah struktur sehingga dapat digunakan untuk analisis molekul senyawa. Metode kromatografi gas dapat memisahkan komponen – komponen dalam sampel dan memberikan output berupa kromatogram.

1) Teknis Kerja Kromatografi Gas – Spektrometri Massa

Mula – mula suntikkan sampel ke dalam injection port. Instrumen Kromatograf Gas menguapkan sampel, kemudian memisahkan dan menganalisa komponen – komponen yang terkandung didalam sampel. Idealnya tiap komponen akan membentuk suatu puncak spesifik yang akan terekam pada kertas elektronik. Dalam metode kromatografi gas dikenal dengan istilah waktu retensi, yaitu interval waktu antara injeksi sampel sampai munculnya puncak maksimum. Data waktu retensi dapat membantu untuk membedakan beberapa senyawa. Ukuran puncak yang terbentuk adalah proporsional terhadap kuantitas dari substansi yang terkandung dalam spesimen yang dianalisis.

2) Bagian-Bagian dasar instrumen Kromatografi-Gas-Spektrometri Massa adalah sebagai berikut:

- a) Sumber gas dan Pengaturan aliran (regulator aliran) Gas dengan kemurnian tinggi diberikan dari tabung bertekanan, atau generator gas helium, nitrogen, karbon dioksida atau hidrogen. Regulator tekanan pada tabung atau generator mengatur jumlah gas yang masuk ke dalam kolom.
- b) Injektor
Injektor berfungsi memasukkan sampel Injector port. Injector port dipanaskan pada suhu 100-300°C, sehingga komponen sampel akan menguap dan gas pembawa akan membawa sampel yang sudah menguap tersebut ke dalam kolom.
- c) Kolom
Kolom terletak di oven yang suhunya dapat diatur secara akurat. Sampel A yang telah diuapkan dalam injektor akan terpisah setelah melewati kolom berdasarkan sifat partisi sampel antara fase gerak dan fase diam.
- d) Oven
Distribusi molekul antara fase gerak dan fase diam tergantung pada suhu kolom. Pada suhu tinggi akan lebih sedikit molekul yang terdapat pada fase diam dari pada fase gerak. Sedikitnya jumlah molekul yang terdapat di dalam fase diam akan menyebabkan migrasi molekul yang lebih cepat sehingga waktu retensi menjadi lebih pendek. Hal ini dapat membawa keuntungan karena waktu yang dibutuhkan dalam proses menjadi lebih pendek, tetapi waktu yang pendek dapat menyebabkan pemisahan komponen menjadi kurang sempurna.
- e) Detektor
Setiap komponen yang keluar dari kolom akan memasuki detektor. Detektor akan berinteraksi dengan komponen tersebut berdasarkan sifat fisika atau kimia. Interaksi yang terjadi dapat menimbulkan

sinyal listrik yang ukurannya menyebutkan jumlah dari komponen. Beberapa detektor yang biasa digunakan adalah Flame Ionization Detector (FID), Thermal Conductivity Detector (TCD), Nitro Phosphorus Detektor Electron Capture Detector (ECD), Mass Selective Detector (MSD) dan PhotoIonization Detector (PID)

f) Data

Sistem data akan menyimpan data dari instrumen berupa plot antara ukuran sinyal terhadap waktu, plot ini disebut kromatogram

F. BIOAUTOGRAFI (22, 24, 26)

Metode bioautografi adalah suatu metode untuk menunjukkan ada tidaknya aktivitas biologi dari senyawa hasil pemisahan dengan KLT terhadap aktivitas tertentu. Prinsipnya adalah menempelkan langsung kromatogram pada media yang telah terinokulasi mikroba uji pada media tersebut setelah diinkubasi dalam jangka tertentu dalam kromatogram yang ditampakan bercaknya dan diukur R_f bercak yang menunjukkan efek anti mikroba. Metode ini menggabungkan penggunaan teknik kromatografi lapis tipis dengan respon dari mikro organism ciri khas dari prosedur bioautografi didasarkan atas teknik difusi agar, dimana senyawa anti mikroba dipindahkan dari lapisan KLT ke medium agar yang telah diinokulasikan dengan merata bakteri uji. Dari hasil inkubasi pada suhu dan waktu tertentu akan terlihat zona hambatan di sekeliling spot dari KLT yang telah ditempelkan pada media agar. Zona hambatan ditampakan oleh aktifitas senyawa aktif yang terdapat didalam bahan yang diperiksa terhadap pertumbuhan mikroorganisme uji. Dalam prakteknya, kromatogram diletakan pada permukaan media agar didalam cawan Petri yang telah diinokulasi dengan mikroorganisme sensitif untuk antibiotik. Setelah diinkubasi selama 15 – 20 jam pada temperatur kira – kira 37°C akan tampak zona jernih pada lapisan media agar yang antibiotiknya berdifusi kelapisan tersebut dan menghambat pertumbuhan mikroorganisme, sedangkan lapisan media agar yang ditumbuhi media mikroorganisme akan tampak buram. Bioautografi

dapat dipertimbangkan karena paling efisien untuk mendeteksi komponen anti mikroba, sebab dapat melokalisir aktivitas meskipun dalam senyawa aktif tersebut terdapat dalam bentuk senyawa kompleks dan dapat pula diisolasi langsung dari komponen yang aktif. Uji bioautografi merupakan metode spesifik untuk mendeteksi bercak pada kromatogram, hasil KLT yang memiliki aktivitas antibakteri, antifungi, antivirus sehingga mendekati separasi dengan uji biologis, keuntungan metode ini adalah sifatnya yang efisien untuk mendeteksi adanya senyawa antimikroba karena letak bercak dapat ditentukan walaupun berada dalam campuran yang kompleks sehingga memungkinkan untuk isolasi senyawa aktif tersebut, kerugiannya adalah metode ini tidak dapat digunakan untuk menentukan KBM. dan KHM

1. Metode Bioautografi dibagi 2:

- a. bioautografi langsung : dengan menyemprot KLT dengan suspensi mikroorganisme ataupun dengan menyentuhkan plat KLT pada permukaan media agar yang telah ditanamai mikroorganisme, setelah diinkubasi pada waktu tertentu, letak senyawa aktif akan tampak sebagai area jernih dengan latar belakang keruh.
- b. bioautografi overlay : dengan menuangkan media agar yang telah dicampur dengan mikroorganisme diatas permukaan plat hingga padat, media kemudian diinkubasi. Area hambatan dilihat dengan penyemprotan tetrazolum klorida. Senyawa yang aktif sebagai antimikroba akan tampak sebagai area jernih dengan latar belakang ungu.

2. Keuntungan dan kerugian metode bioautografi.

Keuntungan

- a. Dapat mendeteksi bercak pada kromatogram hasil KLT yang mempunyai aktivitas sebagai antibakteri, antifungi, antibiotik, dan antiviral.
- b. Dapat digunakan untuk mendeteksi antibiotik yang belum diketahui mekanismenya.
- c. Merupakan metode yang sederhana dan mudah dilakukan.
- d. Cepat dalam pengerjaannya

Kerugian

- a. Tidak bisa digunakan untuk senyawa yang tidak mempunyai aktivitas membunuh atau menghambat mikroorganisme.
- b. Hasil tidak valid karena kemungkinan adanya kontaminan dari luar atau karena zat yang diidentifikasi tidak mengandung khasiat antibakteri
- c. Mempunyai faktor kesalahan yang besar.

3. Petunjuk dalam memilih mengoptimasi fase gerak

- a. Fase gerak harus mempunyai kemurnian yang sangat tinggi karena KLT merupakan teknik yang sensitif.
- b. Daya elusi fase gerak harus diatur sedemikian rupa sehingga harga R_f terletak antara 0,2 sampai 0,8 untuk memaksimalkan pemisahan.
- c. Untuk pemisahan dengan menggunakan fase dipolar seperti silica gel, polaritas fase gerak akan menentukan kecepatan migrasi solute yang berarti juga menentukan nilai R_f .
- d. penambahan pelarut yang bersifat sedikit polar seperti dietil eter kedalam pelarut non polar seperti metilbenzen akan meningkatkan harga R_f secara signifikan
- e. solute - solute ionik dan solute - solute polar lebih baik digunakan campuran pelarut sebagai fase geraknya, seperti campuran air dan metanol dengan perbandingan tertentu. Penambahan sedikit asam etanoat atau ammonia masing – masing akan meningkatkan solute – solute yang bersifat basa dan asam. Pemisahan pada kromatografi lapis tipis yang optimal akan diperoleh hanya jika menotolkan sampel dengan ukuran bercak sekecil mungkin. Sebagaimana dalam prosedur kromatografi yang lain, jika sampel yang digunakan terlalu banyak maka akan menurunkan resolusi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penotolan sampel secara otomatis lebih dipilih dari pada penotolan secara manual terutama jika sampel yang akan ditotolkan lebih dari 15 μ . Penotolan sampel yang tidak tepat akan menyebabkan bercak menyebar dan puncak ganda. Bila sampel telah ditotolkan maka tahap selanjutnya

adalah mengembangkan sampel tersebut dalam suatu bejana kromatografi yang sebelumnya telah djenuhi dengan uap fase gerak. Tepi bagian bawah lempeng lapis tipis yang telah ditotoli sampel celupkan kedalam fase gerak kurang lebih 0,5 – 1cm. tinggi fase gerak dalam bejana harus dibawah lempeng yang telah berisi totalan sampel, bejana kromatografi harus tertutup rapat dan sedapat mungkin volume fase gerak sedikit mungkin (akan tetapi mampu mengelusi lempeng sampai ketinggian lempeng yang telah ditentukan). Untuk melakukan penjenuhan fase gerak, biasanya bejana dilapisi dengan kertas saring. Jika fase gerak telah mencapai ujung atas kertas saring, maka dapat dikatakan bahwa fase gerak telah jenuh. Selama proses elusi , bejana kromatografi harus ditutup rapat, misalkan dengan lembar aluminium dan sebagainya. Bercak pemisaha pada KLT umumnya merupakan bercak yang tidak berwarna. Untuk penentuannya dapat dilakukan secara kimia dan fisika. Cara kimia yang biasa digunakan adalah mereaksikan bercak dengan suatu pereaksi melalui cara penyemprotan sehingga bercak menjadi jelas. Cara fisik yang dapat digunakan untuk menampakkan bercak adalah dengan pencacahan radio aktif dan flouresensi sinar ultra violet. Flouresensi sinar ultra violet terutama untuk senyawa yang dapat berflouresensi, membuat bercak akan terlihat jelas. Jika senyawa tidak dapat berflouresensi maka bahan penjerapnya akan diberi indikator yang berflouresensi, dengan demikian bercak akan kelihatan hitam sedangkan latar belakangnya akan kelihatan berflouresensi

4. Cara-cara kimiawi untuk mendeteksi bercak

- a. Menyemprot lempeng KLT dengan reagen kromogenik yang akan bereaksi secara kimia dengan seluruh solute yang mengandung gugus fungsional tertentu sehingga bercak menjadi berwarna. Kadang-kadang lempeng dipanaskan terlebih dahulu untuk mempercepat reaksi pembentukan warna dan intensitas warna bercak.

- b. Mengamati lempeng dibawah lampu ultraviolet yang dipasang panjang emisi 254 atau 366nm untuk menampakkan solute sebagai bercak yang gelap atau bercak yang berflouresensi terang pada dasar berflouresensi seragam.
- c. Menyemprot lempeng dengan asam sulfat pekat atau asam nitrat pekat lalu dipanaskan untuk menoksidasi solute-solute organik yang akan nampak sebagai bercak hitam sampai kecoklat-coklatan.
- d. Memaparkan lempeng dengan uap iodium dalam chamber tertutup.
- e. Melakukan scanning pada permukaan lempeng dengan densitometer, suatu instrumen yang dapat mengukur intensitas radiasi yang direfleksikan dari permukaan lempeng ketika disinari dengan lampu uv atau lampu sinar tampak solute-solute yang mampu menyerap sinar akan dicatat sebagai puncak (peak) dalam pencatat(recorder). Reagen yang digunakan sebagai penampak bercak dalam KLT dapat dibedakan menjad dua, yaitu reagen umum(yang berlaku untuk hampir semua senyawa organik) dan reagen selektif yang hanya mendeteksi jenis atau golongan senyawa tertentu. nilai Rf (Reterdation factor) merupakan parameter karakteristik kromatografi lapis tipis. nilai ini merupakan ukuran kecepatan migrasi suatu senyawa pada kromatogram. Nilai Rf ini didefinisikan sebagai perbandingan antara jarak yang ditempuh pelarut pengembang.

G. SPEKTROFOTOMETRI ULTRA VIOLET-CAHAYA TAMPAK (25)

Spektrofotometri adalah pengukuran serapan atau emisi radiasi elektromagnetk suatu zat pada panjang gelombang tertentu yang hampir monokromatis. Spektrofotometer adalah suatu alat yang digunakan untuk mengukur serapan suatu sampel sebagai fungsi panjang gelombang. Spektrofotometer sesuai dengan namanya adalah alat yang terdiri dari spektrometer dan fotometer.

Spektrometer menghasilkan sinar dan spektrum dengan panjang gelombang tertentu dan fotometer adalah alat pengukur intensitas cahaya yang ditransmisikan atau yang diserap. Pengukuran serapan dapat dilakukan pada

daerah ultra violet (UV) dengan panjang gelombang 180 – 380 nm atau pada daerah cahaya tampak pada panjang gelombang 380 – 780 nm. Penggunaan spektrofotometri cahaya tampak dibidang farmasi telah dikenal sebagai metode utama, baik untuk identifikasi, pemeriksaan kemurnian maupun penetapan kadar obat. Selain itu, pengukuran dengan teknik ini dapat dipakai untuk analisis zat dalam jumlah atau kadar yang kecil. Suatu spektrofotometer tersusun dari sumber cahaya yang kontinu, monokromator, sel pengabsorpsi untuk larutan sampel atau blanko dan suatu alat untuk mengukur perbedaan serapan antara sampel dan blanko atau pun pembanding.

Komponen penting dari suatu spektrofotometer UV – Vis sebagai berikut

1. Sumber cahaya

a. Radiasi Ultraviolet (UV)

Sumber energi yang digunakan untuk daerah ultraviolet adalah sebuah lampu hidrogen atau deuterium yang digunakan pada daerah sekitar 180 – 380 nm.

b. Radiasi cahaya tampak (Visibel)

Sumber energi radiasi yang digunakan untuk daerah visibel adalah sebuah lampu pijar dari kawat Wolfram yang digunakan pada daerah sekitar 380 – 780 nm.

2. Monokromator.

Digunakan untuk mengubah cahaya polikromatis menjadi monokromatis. Alatnya dapat berupa prisma atau grating (filter).

3. Sel sampel atau kuvet.

Kuvet merupakan wadah untuk menempatkan cairan yang meresap sinar dari sumber energi radiasi, kuvet yang digunakan harus dari bahan yang transparan. Sel yang digunakan untuk daerah cahaya tampak terbuat dari kaca sedangkan untuk daerah ultra violet terbuat dari silika atau kuarsa

dengan ketebalan 1 cm. sel peresap ini diletakan sinar monokromator untuk memperkecil kemungkinan penguraian atau flouresensi yang disebabkan oleh radiasi dengan panjang gelombang berenergi tinggi dari radiasi yang masih polikromatis.

4. Detektor A

Berfungsi untuk mengubah energi radiasi menjadi energi sinyal listrik dan memberikan respon terhadap cahaya pada beberapa panjang gelombang. Detektor yang biasa dipakai adalah fotomultiplier tube.

5. Amplifier

Amplifier merupakan alat untuk memperkuat sinyal yang dihasilkan oleh detektor

6. Rekorder

Berfungsi untuk merekam sinyal berupa data yang dapat dibaca. Analisa kuantitatif secara spektrometri umumnya didasarkan atas pengukuran serapan dari larutan zat dalam pelarut yang cocok pada panjang gelombang serapan maksimum dari zat tersebut, hubungan antara serapan dengan konsentrasi larutan dinyatakan dengan hukum Lambert – Beer

Rumus Lambert – Beer

$$A = a \cdot b \cdot c$$

Keterangan

A = Serapan

a = Daya Serap

b = Tebal larutan (cm)

c = Konsentrasi larutan

H. SPEKTROFOTOMETRI INFRARED (IR)

Spektrofotometri merupakan suatu metode analisa yang didasarkan pada pengukuran serapan sinar monokromatis oleh suatu lajur larutan berwarna pada panjang gelombang spesifik dengan menggunakan monokromator prisma atau kisi difase dengan detektor fototube. Spektrum Peresapan Inframerah suatu zat merupakan sifat fisika yang khas dan dapat digunakan sebagai pengenalan. Daerah inframerah dalam spektrum radiasi elektromagnetik meliputi panjang gelombang antara 0,78 m, sesuai dengan 4000-1 cm sampai 667-1 cm, yaitu daerah yang paling banyak digunakan untuk identifikasi. Selain natrium klorida digunakan juga kisi-kisi sebagai monokromator.

Dasar spektrofotometri Inframerah dikemukakan oleh Hooke dan didasarkan atas senyawa yang terdiri atas dua atom atau diatom yang digambarkan dengan dua buah bola yang saling terikat oleh pegas seperti tampak pada gambar disamping ini. Jika pegas direntangkan atau ditekan pada jarak keseimbangan tersebut maka energi potensial dari sistem tersebut akan naik. Dari pembagian daerah spektrum elektromagnetik tersebut diatas, daerah panjang gelombang yang digunakan pada alat spektrofotometer infra merah adalah pada daerah infra merah pertengahan, yaitu pada panjang gelombang 2,5 – 50 μm atau pada bilangan gelombang 4.000 – 200 cm^{-1} . Satuan yang sering digunakan dalam spektrofotometri inframerah adalah bilangan gelombang atau disebut juga sebagai Kaiser. Bila ikatan bergetar, maka energi vibrasi secara terus menerus dan secara periodik berubah dari energi kinetik ke energi potensial dan sebaliknya. Jumlah energi total adalah sebanding dengan frekwensi vibrasi dan tetapan gaya (k) dari pegas dan massa (m1 dan m2) dari dua atom yang terikat. Energi yang dimiliki oleh sinar infra merah hanya cukup kuat untuk mengadakan perubahan vibrasi.

Dalam spektrofotometri inframerah panjang gelombang dan bilangan gelombang adalah nilai yang digunakan untuk menunjukkan posisi dalam spektrum serapan. Panjang gelombang biasanya diukur dalam mikron atau mikro meter (μm). Sedangkan bilangan gelombang adalah frekwensi dibagi

dengan kecepatan cahaya, yaitu kebalikan dari panjang gelombang dalam satuan cm^{-1} .

Atom-atom di dalam suatu molekul tidak diam melainkan bervibrasi (bergetar). Energi dari kebanyakan vibrasi molekul berhubungan dengan daerah infra merah. Vibrasi molekul dapat dideteksi dan diukur pada spektrum inframerah. Bila radiasi infra merah dilewatkan melalui suatu cuplikan, maka molekul-molekulnya dapat menyerap (mengabsorpsi) energi dan terjadilah transisi diantara tingkat vibrasi dasar (ground state) dan tingkat vibrasi tereksitasi (excited state). Pengabsorbsian energi pada berbagai frekwensi dapat dideteksi oleh spektrometer infra merah, yang memplot jumlah radiasi inframerah yang diteruskan melalui cuplikan sebagai fungsi frekwensi (atau panjang gelombang) radiasi. Plot itu disebut spektrum inframerah yang akan memberikan informasi penting tentang gugus fungsional suatu molekul.

Spektrofotometer adalah alat untuk mengukur transmittan atau absorban suatu sampel sebagai fungsi panjang gelombang. Sedangkan pengukuran menggunakan spektrofotometer ini, metode yang digunakan sering disebut dengan spektrofotometri. Spektrofotometri dapat dianggap sebagai perluasan suatu pemeriksaan visual dengan studi yang lebih mendalam dari absorpsi energi. Absorpsi radiasi oleh suatu sample diukur pada berbagai panjang gelombang dan dialirkan oleh suatu perekam untuk menghasilkan spektrum tertentu yang khas untuk komponen yang berbeda.

Interaksi Sinar Inframerah Dengan Molekul

Dasar Spektroskopi Inframerah dikemukakan oleh Hooke dan didasarkan atas senyawa yang terdiri atas dua atom atau diatom yang digambarkan dengan dua buah bola yang saling terikat oleh pegas seperti tampak pada gambar disamping ini. Jika pegas direntangkan atau ditekan pada jarak keseimbangan tersebut maka energi potensial dari sistim tersebut akan naik. Setiap senyawa pada keadaan tertentu telah mempunyai tiga macam gerak, yaitu:

1. Gerak Translasi, yaitu perpindahan dari satu titik ke titik lain.
2. Gerak Rotasi, yaitu berputar pada porosnya, dan

3. Gerak Vibrasi, yaitu bergetar pada tempatnya.

Tabel II.1 Serapan Khas Beberapa Gugus fungsi

Gugus	Jenis Senyawa	Daerah Serapan (cm ⁻¹)
C-H	alkana	2850-2960, 1350-1470
C-H	alkena	3020-3080, 675-870
C-H	aromatik	3000-3100, 675-870
C-H	alkuna	3300
C=C	Alkena	1640-1680
C=C	aromatik (cincin)	1500-1600
C-O	alkohol, eter, asam karboksilat, ester	1080-1300
C=O	aldehida, keton, asam karboksilat, ester	1690-1760
O-H	alkohol, fenol(monomer)	3610-3640
O-H	alkohol, fenol (ikatan H)	2000-3600 (lebar)
O-H	asam karboksilat	3000-3600 (lebar)
N-H	Amina	3310-3500
C-N	Amina	1180-1360
-NO ₂	Nitro	1515-1560, 1345-1385

BAB III

RANCANGAN PENELITIAN

A. PRINSIP PENELITIAN

Tanaman batang brotowali (*Tinospora crispa* (L)) dideterminasi dan selanjutnya serbuk simplisia diekstraksi dengan cara sokletasi menggunakan pelarut etanol 96% ekstrak yang diperoleh dipekatkan dengan *rotavapor* hingga diperoleh ekstrak kental, dari ekstrak etanol sebagian dilakukan penapisan fitokimia dan sebagian ekstrak etanol dipartisi dengan pelarut yang memiliki polaritas berbeda, yaitu dengan *n* – heksan dan etil asetat. Kemudian dilakukan pengujian aktivitas anti bakteri dengan metode difusi cakram dan selanjutnya ekstrak yang memiliki aktivitas anti bakteri tertinggi diidentifikasi menggunakan kromatografi lapis tipis dan dilanjutkan dengan metode bioautografi, kromatografi gas – spektrometri massa dan spektrofotometri infrared (IR).

B. TEMPAT PENELITIAN

Penelitian dilakukan di :

1. Pusat penelitian Biologi *Herbarium Bogoriense*, Cibinong Bogor Jawa Barat untuk memastikan kebenaran tanaman yang akan digunakan dalam penelitian
2. Laboratorium Farmakognosi Jurusan Farmasi Politeknik Kesehatan Departemen Kesehatan Jakarta II, Jl. Percetakan Negara nomor 23 Jakarta Pusat, melakukan penafisan fitokimia
3. Pusat Penelitian kimia, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Jl. Raya Serpong Tangerang melakukan fasanasi ekstrak untuk uji anti mikroba dengan metode difusi cakram, KLT, metode bioautografi dan spektrofotometri infra red (IR)
4. Laboratorium Forensik Mabes POLRI Blok M Jakarta Selatan untuk pengambilan data kromatografi gas-spektrometri massa (GCMS).

C. TAHAP PENELITIAN

1. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di Pusat Penelitian Biologi *Herbarium Bogoriense* Cibinong Jawa Barat, untuk memastikan kebenaran tanaman yang akan digunakan dalam penelitian

2. Penyediaan bahan penelitian

Batang brotowali (*Tinospora crispa L*) diperoleh dari Balitro Bogor, Jl. Tentara Pelajar No. 3 Bogor Jawa Barat

3. Ekstraksi

Ekstraksi dilakukan di Balitro Bogor, Jl. Tentara Pelajar No. 3 Bogor Jawa Barat

4. Uji Penapisan fitokimia

Penapisan Fitokimia terhadap kandungan golongan senyawa kimia seperti flavonoid, alkaloida, tanin, saponin, dan terpenoid

5. Partisi

6. Uji anti mikroba dengan metode difusi cakram

7. Analisis Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan uji anti mikroba dengan metode bioautografi.

8. Identifikasi senyawa kimia sebagai antimikroba dengan spektrofotometri infra red (IR) dan kromatografi gas – spektrometri massa (GCMS).

BAB IV

BAHAN ALAT DAN METODE PENELITIAN

A. BAHAN

1. Bagian tanaman yang digunakan adalah batang brotowali yang diperoleh dari Balitro Bogor
2. Bahan kimia dan zat tambahan, etanol 96%, *n*-heksan, etil asetat, pereaksi meyer, aquades, metanol, kloroform, amil alkohol, asam sulfat, feri klorida, alumunium klorida dan nutrient agar.
3. Mikroba uji diperoleh dari laboratorium kimia LIPI Serpong Tangerang dan Fakultas Farmasi Universitas Pancasila
4. *Staphylococcus aureus* biakan
5. *Bacillus substillis* biakan
6. *Candida albicans* biakan

B. ALAT

Peralatan yang digunakan untuk ekstraksi adalah alat maserasi, penguap putar rotary evaporator, batang pengaduk, beaker, Erlenmeyer dan gelas ukur.

Peralatan untuk pengujian spektrofotometri-sinar UV, spektrofotometri IR, Kromatografi gas, spektrometri massa, cawan Petri, jangka sorong, oven, autoklaf, mikro filter, pinset, lampu spiritus dan penggaris.

C. METODE

1. Determinasi tanaman

Sebelum dilakukan penelitian, dilakukan determinasi tanaman batang brotowali untuk memastikan kebenaran tanaman sebagai bahan penelitian. Determinasi dilakukan di *herbarium bogoriense* bidang botani Pusat Penelitian Biologi, LIPI Cibinong, Jawa Barat

2. Asal utama bahan penelitian

Ekstrak batang brotowali berasal dari Balitro Jl. Tentara Pelajar 3 Bogor

3. Partisi

Ekstrak kental etanol 96% yang diperoleh dipartisi dengan cara menambahkan sejumlah ekstrak kedalam pelarut *n* – heksan kemudian ditambahkan aquades dengan perbandingan yang sama lalu diaduk menggunakan vortek sehingga diperoleh 2 lapisan yang tidak bercampur, lapisan air dipisahkan dari pelarut selanjutnya fase air dilakukan proses yang sama dengan pelarut etil asetat hasil fase yang diperoleh dipekatkan dengan penguap putar lalu dimasukan ke dalam oven pada suhu 50°C hingga diperoleh fase kental.

4. Penapisan fitokimia

Dilakukan terhadap ekstrak etanol kental untuk mengidentifikasi senyawa kimia yang terkandung ke dalam bahan yang digunakan. Hasil penapisan fitokimia terhadap ekstrak etanol batang brotowali dapat dilihat pada Tabel V.1

a. Identifikasi golongan alkaloid

Sebanyak 2 gram serbuk atau 40 mg ekstrak dilembabkan dengan 5 ml ammonia 30% digerus dalam mortir, kemudian dtambahkan 20 ml klorofom dan digerus kembali dengan kuat, campuran tersebut disaring, didapat larutan organik (larutan A) sebagian dari larutan A (10 ml) di ekstrak dengan 10 ml HCl 1:10 dengan pengocokan dalam tabung reaksi, diambil larutan bagian atasnya (larutan B). Larutan A diteteskan beberapa tetes pada kertas saring dan disemprot atau ditetesi dengan pereaksi Dragendorff, terbentuk warna merah atau jingga pada kertas saring menunjukkan adanya senyawa alkaloid. Larutan B dibagi dalam dua tabung reaksi, ditambahkan masing masing pereaksi Dragendorff dan Meyer, terbentuk endapan warna merah bata dengan

pereaksi Dragendorff dan endapan putih dengan pereaksi Meyer menunjukkan adanya senyawa alkaloid

b. Identifikasi golongan steroid dan triterpenoid

Sebanyak 1 gram serbuk atau 40 mg ekstrak dimaserasi dengan 20 ml selama 2 jam (dalam wadah dengan penutup rapat), kemudian disaring dan diambil filtratnya. Sebanyak 5 ml dari filtrat tersebut diuapkan dalam cawan penguap dengan pemanas air hingga diperoleh residu. Kedalam residu ditambahkan 2 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat (pereaksi Liebermann Burchard) terbentuknya warna hijau atau merah menunjukkan adanya senyawa golongan steroid atau triterpenoid.

c. Identifikasi golongan flavonoid

Terhadap 2 gram serbuk atau 40 mg ekstrak ditambahkan 100 ml air panas, dididihkan selama 5 menit, disaring dengan kertas saring hingga diperoleh filtrat yang kemudian digunakan sebagai larutan percobaan ke dalam 5 ml larutan percobaan (dalam tabung reaksi) dibubuhkan serbuk atau lempeng magnesium secukupnya dan ditambah 1 ml asam klorida pekat serta 5 ml amil alkohol. Dikocok kuat dan dibiarkan memisah, terbentuknya warna merah kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol menunjukkan adanya senyawa golongan flavonoid.

d. Identifikasi golongan saponin

Sebanyak 10 ml larutan percobaan yang diperoleh dari identifikasi golongan flavonoid dimasukkan kedalam tabung reaksi dan di kocok selama 10 detik secara vertikal menggunakan vortex, kemudian dibiarkan 10 menit terbentuknya busa yang stabil dalam tabung reaksi menunjukkan adanya senyawa golongan saponin, bila ditambahkan 1 tetes asam klorida 1 % busa tetap stabil.

e. Identifikasi golongan tanin

Terhadap 2 gram serbuk atau 40 gram ekstrak ditambahkan 100 ml air. Didihkan selama 15 menit, didinginkan dan disaring dengan kertas saring, kemudian filtrat dibagi dua bagian, kedalam filtrat bagian pertama ditambahkan larutan besi (III) klorida 1% terbentuknya warna biru tua atau hijau kehitaman menunjukkan adanya senyawa golongan tanin. Kedalam filtrat bagian kedua ditambahkan 15 ml pereaksi stiasny (formaldehida), endapan merah muda menunjukkan adanya tanin katekuat.

5. Uji daya antimikroba ekstrak batang brotowali terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, dan *Candida albicans*

a. Sterilisasi

Persiapan awal untuk uji antimikroba:

1) Sterilisasi dengan autoklaf

Media dan pereaksi disterilkan pada suhu 121⁰C selama 15 menit

2) Sterilisasi dengan oven

Suhu yang digunakan 150-170⁰C selama 1 jam, untuk alat seperti cawan Petri, Erlemeyer, tabung reaksi, Beaker , gelas ukur dan pipet volum.

3) Sterilisasi dengan api bunsen (tehnik aseptis)

Untuk alat seperti jarum ose, pinset dan mulut tabung reaksi dilakukan dengan cara memanaskan alat tersebut diatas api Bunsen langsung selama beberapa saat diamkan sebentar sebelum digunakan.

b. Penyiapan mikroba uji

1) Pembuatan Media agar miring

Media pembenihan menggunakan *Nutrien Agar (NA)* dibuat dengan cara melarutkan 28 gr NA kedalam 1 liter air suling kemudian dipanaskan sampai larut, sterilkan pada suhu 121⁰C selama 15

menit. Kemudian dituangkan kedalam beberapa tabung reaksi steril dan dimiringkan, diamkan sampai membeku (disebut media agar miring).

2) Pemiakan bakteri (*Regenerasi Mikroba*)

Ambil satu sengkeli bakteri dari biakan murni *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, dan *Candida albicans* dengan menggunakan ujung ose steril, masukkan kedalam tabung reaksi berisi media agar miring (*Nutrien agar*) dengan cara menggoreskan secara zig-zag diseluruh lempeng secara merata, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

c. Uji aktivitas antibakteri sampel (ekstrak etanol batang brotowali)

Ekstrak etanol batang brotowali yang dipartisi dengan *n*-heksan, etil asetat dan air dilakukan uji aktivitas antibakterinya terhadap *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* dan *Candida albicans* dengan metode difusi cakram. Prosedur Kerja:

1. Masukkan 500µl suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* dengan menggunakan mikropipet, kedalam cawan Petri steril.
2. Tambahkan 20 ml *Nutrien agar* (NA), kemudian diratakan dengan spreader, biarkan sampai membeku.
3. Kedalam cawan Petri media agar yang sudah dingin(beku), dibagi 4 bagian, letakkan kertas cakram steril menggunakan ujung mikro pipet, tekan dengan pinset steril agar kertas cakram benar-benar menempel pada media agar.
4. Masukkan masing-masing 20 µl larutan ekstrak etanol batang brotowali (dengan konsentrasi 10%, 5%, 2,5%, dan 1,25% dengan penotolan pada kertas cakram menggunakan mikro pipet dan dilakukan secara triplo.
5. Inkubasi pada suhu 37°C selama 24jam.

6. Hal yang sama dilakukan terhadap larutan uji fase *n*-heksan, fase etil asetat, dan fase air.
7. Hal yang sama juga dilakukan uji antibakteri *Bacillus subtilis*, dan *Candida albicans*

d. Uji aktivitas antibakteri standar streptomisin

Prosedur kerja

1. Masukkan 500µl suspensi bakteri dengan menggunakan mikropipet, kedalam cawan petri steril.
2. Tambahkan 20 ml *Nutrien agar (NA)*, kemudian diratakan dengan spreader, biarkan sampai memadat.
3. Kedalam cawan petri media agar yang sudah memadat, dibagi 4 bagian, letakkan kertas cakram steril menggunakan ujung mikro pipet, tekan dengan pinset steril agar kertas cakram benar-benar menempel pada media agar.
4. Masukkan masing-masing 10 µl larutan streptomisin (dengan konsentrasi 1%, 0,5%, 0,25%, dan 0,125% dengan penotolan pada kertas cakram menggunakan mikro pipet, pengerjaan dilakukan dengan triplo.
5. Inkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam. Efektifitas antibakteri dinyatakan efektif, apabila disekitar kertas cakram terdapat zona bening, zona hambat diukur dengan jangka sorong, kemudian dicatat hasilnya.

e. Uji aktifitas antibakteri fase *n*-heksan batang brotowali dengan metode Bioautografi

Metode bioautografi adalah metode untuk menunjukkan adanya aktivitas antibakteri dari suatu zat. Metode ini merupakan penggabungan tehnik kromatografi lapis tipis dengan respon dari

mikroorganisme. Prinsip metode ini adalah menempelkan langsung kromatogram yang ditampakkan bercaknya dan diukur R_f nya pada media yang telah terinokulasi bakteri uji, kemudian media tersebut diinkubasi dalam jangka waktu tertentu dan amati hambatannya.

Prosedur kerja:

1. Bejana KLT dijenuhkan dengan eluen menggunakan kertas saring
2. Siapkan lempeng KLT berukuran $2x\ 10\ \text{cm}$, kemudian ditandai dengan batas bawah dengan jarak $1,5\ \text{cm}$ dari tepi bawah plat KLT dan batas atas dengan jarak $1\ \text{cm}$ tepi atas, kemudian aktifkan plat KLT dalam oven dengan suhu 40°C selama 10-15 menit.
3. Ekstrak fase *n*-heksan batang brotowali dtotolkan berbentuk garis sebanyak $20\ \mu\text{l}$ dengan menggunakan pipa kapiler.
4. Plat KLT dimasukkan kedalam bejana yang telah jenuh yang sudah dmasukkan eluen (fase gerak), elusi sampai batas atas , ditandai dengan adanya bercak komponen senyawa.
5. Keluarkan plat KLT setelah proses elusi selesai, kemudian dikeringkan hingga bercak tampak dan ukur R_f nya.
6. Penyiapan agar inokula kedalam cawan Petri steril. Tuangkan $500\ \mu\text{l}$ suspensi mikroba uji, kemudian tuangkan Nutrien agar (NA) $20\ \text{ml}$, digoyang-goyang agar bercampur homogen biarkan sampai memadat.
7. Letakkan plat KLT yang sudah diketahui R_f nya dengan posisi terbalik, diamkan selama 15-30 menit, tandai posisi bercak noda pada bagian bawah cawan Petri.
8. Angkat dan keluarkan plat dari permukaan agar.
9. Inkubasi cawan Petri selama 16-18 jam pada suhu $35-37^{\circ}\text{C}$.
10. Amati daerah bening disekitar bercak, yang menunjukkan bahwa bercak tersebut mengandung senyawa antibakteri, dan ukur R_f nya.
11. Plat KLT bercak noda berbentuk pita dikerok dan diekstraksi dengan *n*-heksan, ambil larutan *n*-heksan (lakukan 3x), diuapkan,

dilanjutkan identifikasi dengan spektrofotometri infra red(IR) dan kromatografi gas-spektrometri massa (GCMS).

BAB V

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. DETERMINASI

Hasil determinasi yang dilakukan dipusat penelitian biologi *Herbarium Bogoriense* adalah batang brotowali (*Tinospora crispa* L.), familia Menispermaceae. Hasil determinasi dapat dilihat pada Lampiran 1 dan batang brotowali dilihat pada Lampiran 2.

B. EKSTRAK ETANOL BATANG BROTOWALI

Sejumlah serbuk batang brotowali diekstraksi dengan 10 bagian etanol 96% pada maserator, rendam selama 6 jam pertama sambil sekali-sekali diaduk, kemudian diamkan 1 jam. Pisahkan maserat dengan filtrasi (kertas saring). Ulangi penyarian sekurang-kurangnya dua kali dengan jenis dan pelarut yang sama. Kumpulkan semua maserat, kemudian diuapkan dengan evaporator hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental batang brotowali yang diperoleh adalah 148,6 gram (rendaman 14,86%)

C. PENAPISAN FITOKIMIA

Hasil penapisan fitokimia yang terdapat dalam ekstrak batang brotowali sesuai seperti yang tertera pada monografi ekstrak yang terdapat pada Tabel V.1 berikut:

Tabel V.1 Hasil Penapisan Fitokimia

NO	Uji Penapisan	Pereaksi	Brotowali	Persyaratan
1	Tamin	FeCl ₃	(+) Hijau kehitaman	Warna biru tua atau hijau kehitaman
2	Saponin	HCl 1 %	(+) terbentuk buih	Terbentuk buih dan buih tidak hilang dalam 10 menit
3	Flavonoid	Seng dan HCl	(-) biru keabu - abuan	Warna merah (flavonoid)
		Magnesium dan HCl	(+) kuning jingga	Warna kuning jingga (flavon, kalkon dan auron)
		As. Borat dan As. Oksalat kemudian eter	(-) larutan berwarna merah tidak berfluoresensi	Warna kuning berfluoresensi (flavonoid)
4	Alkaloid	Meyer	(+) endapan warna putih	Endapan berwarna putih
		Dragendorff	(+) endapan warna merah	Endapan warna merah
5	Steroid dan Triterpenoid	As. Asetat anhidrat dan H ₂ SO ₄	(+) merah, ungu, biru, hijau	Perubahan warna
6	Glikosida	H ₂ SO ₄	(+) biru	Warna biru atau hijau (reaksi Liebermann Burchard)

Hasil pengujian menunjukkan bahwa ekstrak brotowali mengandung senyawa golongan tanin, saponin, alkaloid, glikosida, golongan steroid dan golongan flavonoid.

D. UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI METODE DIFUSI CAKRAM

Berdasarkan hasil penelitian uji aktivitas antibakteri menunjukkan bahwa fase *n*-heksan menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Bacillus Subtillis*, tidak menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *Candida albicans*. Sedangkan ekstrak etanol, fase etil asetat, dan fase air, tidak menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*, *Bacillus Subtillis* dan *candida albicans*.

Tabel V.2 Diameter Daerah Hambatan Aktivitas antimikroba ekstrak batang brotowali (*Tinospora crispa L*) dengan metode difusi cakram

NO	Ekstrak Uji 10%	Bakteri Uji	Diaemet daerah hambat (mm)				
			1	2	3	Rata – rata	Streptomisin 1%
1	Ekstrak etanol	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-
		<i>Bacillus subtillis</i>	-	-	-	-	-
		<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-
2	Fase <i>n</i> -heksan	<i>Staphylococcus aureus</i>	19,0	19,24	19,30	19,18	22,25
		<i>Bacillus subtillis</i>	11,25	11,30	11,34	11,30	17,20
		<i>Candlida albicans</i>	-	-	-	-	-
3	Fase Etil Asetat	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-
		<i>Bacillus subtillis</i>	-	-	-	-	-
		<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-
4	Fase Air	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-
		<i>Bacillus subtillis</i>	-	-	-	-	-
		<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-

Tabel V.3 Diameter Daerah Hambatan Aktivitas antimikroba ekstrak batang brotowali (*Tinospora crispa L*) dengan metode difusi cakram

NO	Ekstrak Uji 5%	Bakteri Uji	Diaemet daerah hambat (mm)				
			1	2	3	Rata - rata	Streptomisin 0,5%
1	Ekstrak etanol	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	
		<i>Bacillus subtillis</i>	-	-	-	-	
		<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	
2	Fase n-heksan	<i>Staphylococcus aureus</i>	17,3	17,35	17,45	17,34	17,45
		<i>Bacillus subtillis</i>	9,56	9,54	9,51	9,54	14,51
		<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-
3	Fase Etil Asetat	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-
		<i>Bacillus subtillis</i>	-	-	-	-	-
		<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-
4	Fase Air	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-
		<i>Bacillus subtillis</i>	-	-	-	-	-
		<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-

Tabel V.4 Diameter Daerah Hambatan Aktivitas antimikroba ekstrak batang brotowali (*Tinospora crispa L*) dengan metode difusi cakram

NO	Ekstrak Uji 2,5%	Bakteri Uji	Diameter daerah hambat (mm)				
			1	2	3	Rata-rata	Streptomisin 0,25%
1	Ekstrak Etanol	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-
		<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	-
		<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-
2	Fase n-heksan	<i>Staphylococcus aureus</i>	16,58	16,55	16,51	16,55	16,60
		<i>Bacillus subtilis</i>	9,56	9,54	9,51	9,54	19,39
		<i>Candida albicans</i>	-	-	-	--	-
3	Fase Etil asetat	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-
		<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	-
		<i>Caandida albicans</i>	-	-	-	-	-
4	Fase Air	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-
		<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	-
		<i>Caandida albicans</i>	-	-	-	-	-

Tabel V.5 Diameter Daerah Hambatan Aktivitas antimikroba ekstrak batang brotowali (*Tinospora crispa L*) dengan metode difusi cakram

NO	Ekstrak Uji 1,25%	Bakteri Uji	Diameter daerah hambat (mm)				
			1	2	3	Rata-rata	Streptomisin 0,125%
1	Ekstrak Etanol	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-
		<i>Bacillus subtillis</i>	-	-	-	-	-
		<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-
2	Fase n-heksan	<i>Staphylococcus aureus</i>	14,60	14,58	14,50	14,56	14,60
		<i>Bacillus subtillis</i>	7,56	7,54	7,51	7,54	14,39
		<i>Candida albicans</i>	-	-	-	--	-
3	Fase Etil asetat	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-
		<i>Bacillus subtillis</i>	-	-	-	-	-
		<i>Caandida albicans</i>	-	-	-	-	-
4	Fase Air	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-
		<i>Bacillus subtillis</i>	-	-	-	-	-
		<i>Caandida albicans</i>	-	-	-	-	-

Hasil pengukuran daerah daya hambat dari ekstrak etanol batang brotowali, fase n-heksan, fase etil asetat, dan fase air, menunjukkan bahwa ekstrak n-heksan pada konsentrasi 10%, 5%, 2,5%, 1,25% mempunyai aktivitas anti bakteri terhadap *staphylococcus aureus* dan *Bacillus subtillis*, tidak menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *Candida albicans* sedangkan ekstrak etanol, fase etil asetat, dan fase air tidak menunjukkan adanya hambatan (aktivitas antibakteri). Ekstrak n-heksan batang brotowali pada konsentrasi 10% menunjukkan diameter daerah hambat terhadap bakteri *staphylococcus aureus* dengan tiga kali pengulangan 19,18mm, *Bacillus subtillis* 11,30mm, pada konsentrasi 5% menunjukkan

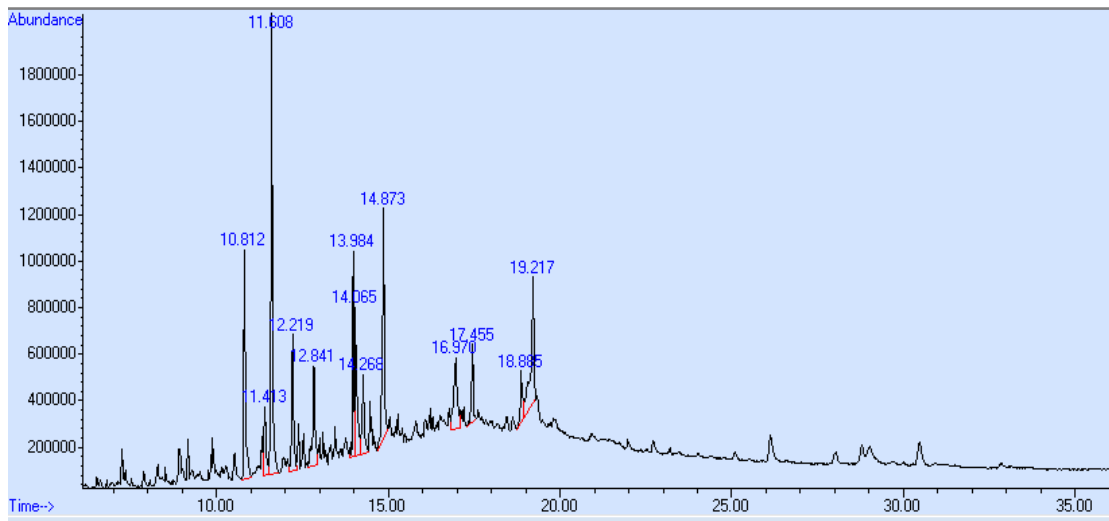
diameter daerah hambat terhadap bakteri *staphylococcus aureus* dengan tiga kali pengulangan (17,34mm), *Bacillus subtilis* (9,54mm), pada konsentrasi 2,5% menunjukkan diameter daerah hambat terhadap bakteri *staphylococcus aureus* dengan tiga kali pengulangan (16,55mm), *bacillus subtilis* (9,54 mm), dan pada konsentrasi terendah 1,25 % menunjukkan diameter daerah hambat terhadap bakteri *staphylococcus aureus* dengan tiga kali pengulangan (14,56mm), *bacillus subtilis* (7,54 mm). Sedangkan terhadap *Candida albicans*, fase *n*-heksan tidak menunjukkan adanya diameter daerah hambat. Pada ekstrak etanol, fase etil asetat, dan fase air, tidak menunjukkan adanya hambatan terhadap ketiga bakteri uji.

E. UJI BIOAUTOGRAFI

Dengan mencoba berbagai konsentrasi cairan pengembang *n*-heksan:etil asetat (10:1, 5:1 dan 2:1), KLT dengan eluen *n*-heksan : etil asetat (5:1) merupakan eluen terbaik menghasilkan 4 bercak dan terjadi hambatan pada R_f 42,8.

F. IDENTIFIKASI SENYAWA KIMIA AKTIF EKSTRAK *n*-HEKSAN BATANG BROTOWALI (*TINOSPORA CRISPA* L) DENGAN KROMATOGRAFI GAS-SPEKTROMETRI MASSA (GCMS)

Identifikasi dengan kromatografi gas-spektrometri massa (GCMS), dilakukan terhadap ekstrak fase *n*-heksan pada uji aktivitas antimikroba, setiap senyawa hasil pemisahan dianalisa lebih lanjut untuk mengetahui berat molekul dan spektra fragmentasinya, selanjutnya dibandingkan dengan spektra fragmentasi senyawa yang terdapat dalam sistem data base WILEY serta dipilih senyawa yang memiliki kemiripan lebih besar atau sama dengan 90% dapat dilihat pada Gambar V. 1



Gambar V.1 Pola Total kromatogram ekstrak *n*-heksan batang brotowali.

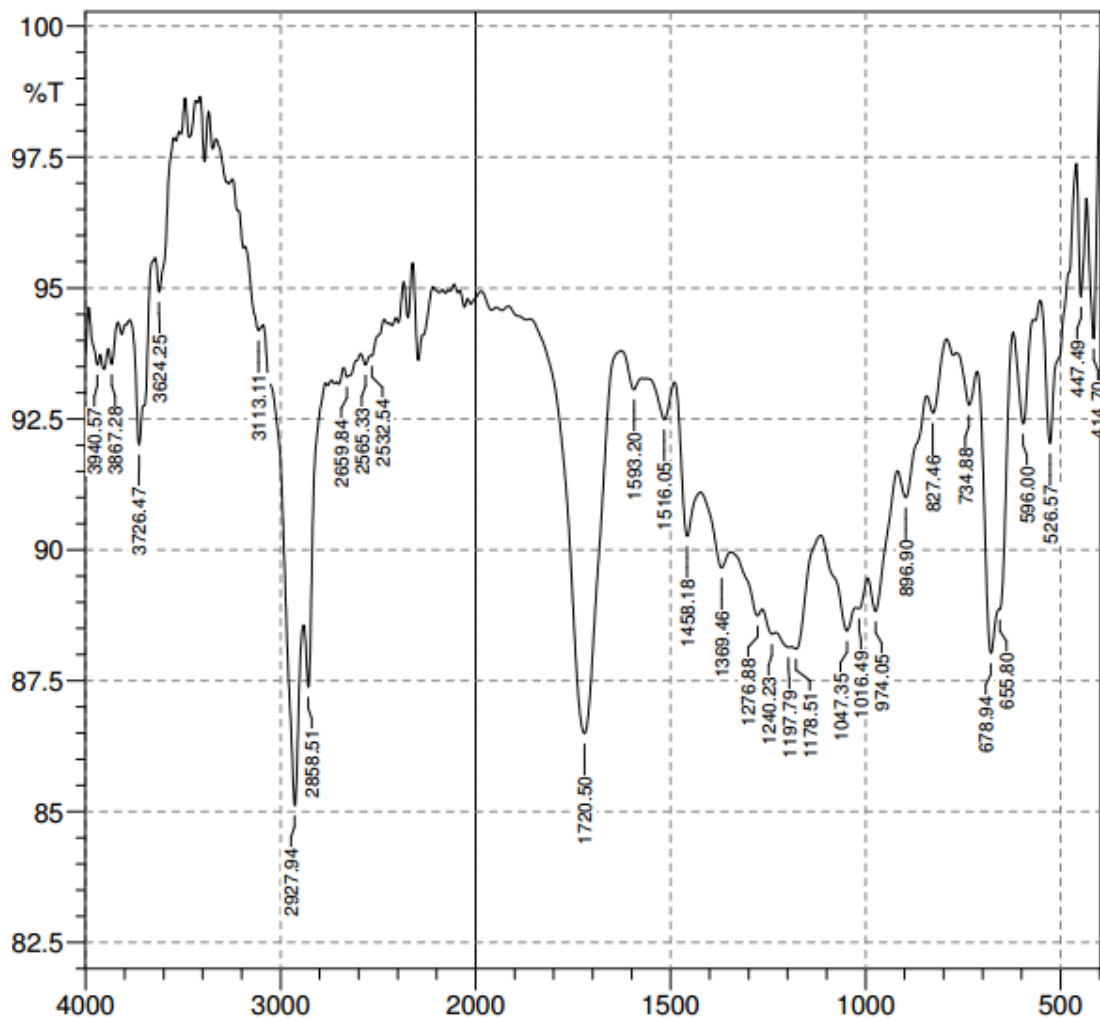
Kromatogram ekstrak *n*-heksan menunjukkan adanya puncak (peak) dengan waktu retensi 8,300, 10,814, 11,602, 14,871, dan 16,966. Hasil analisa puncak kromatogram masing – masing dengan GCMS menunjukkan bahwa ekstrak fase *n*-heksan mengandung beberapa senyawa yang dapat dilihat pada Tabel V.6 dengan spektrum fragmentasi masing – masing senyawa pada lampiran.

Tabel V.6 Hasil identifikasi kromatogram dengan GCMS ekstrak fase *n*-heksan batang brotowali

No	RT(menit)	Kemungkinan senyawa	Rumus molekul	Berat molekul	Kemiripan(%)
1	8,300	Octanoic acid (CAS) \$\$ Caprylic acid	C ₈ H ₁₆ O ₂	144.12	96
2	10,814	Benzaldehyde, 4-hydroxy-3-methoxy- (CAS) \$\$ Vanillin \$\$	C ₈ H ₈ O ₃	152.05	93
3	11,602	Phenol, 2,4-bis(1,1-	C ₁₄ H ₂₂ O	206.17	95

		dimethylethyl)- \$\$			
4	14,871	Hexadecanoic acid (CAS) \$\$ Palmitic acid \$\$	C16H32O2	256.24	99
5	16,966	Phenol, 4,4'-(1- methylethylidene)bis- \$\$	C15H16O2	228.12	96

G. Identifikasi senyawa kimia aktif ekstrak *n*-heksan batang brotowali (*Tinospora crispa* L) dengan spektrofotometri infra red



Hasil analisa spektrofotometri infra red terhadap ekstrak fase *n*-heksan menunjukkan adanya gugus – gugus fungsi O-H (2400-3400 cm⁻¹), gugus alkena C=C (3000 cm⁻¹), C=O strong (1660-1820 cm⁻¹)

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN

1. Hasil uji aktivitas antimikroba terhadap ekstrak batang brotowali menunjukkan bahwa fase *n*-heksan yang paling aktif terhadap *staphylococcus aureus* dan *bacillus subtilis*.
2. Eluen Kromatografi Lapis Tipis (KLT) yang paling baik dalam pemisahan kromatogram adalah *n*-heksan : etil astetat dengan perbandingan 5 : 1.
3. Hasil identifikasi spektrofotometri infra red (IR) dan kromatografi gas-spektrometri massa (GCMS) senyawa kimia sebagai antimikroba adalah gugus-gugus fungsional CO, CH stretch, alkena(C=C), OH dan senyawa *Hexadecanoic Palmitic acid* dan *Bezaldehyd, 4-hydroxy 3 methoxy vanillin*.

B. SARAN

1. Aktivitas anti mikroba batang brotowali perlu diuji secara in vivo pada hewan percobaan.
2. Perlu penelitian lebih lanjut untuk menentukan struktur kimia dengan pengambilan data spektro RMI proton dan karbon.

DAFTAR PUSTAKA

1. Badan Pengawasan Obat dan Makanan Republik Indonesia, Monografi ekstrak tumbuhan Indonesia Vol.1; 2006. h. 4 – 14, 24 – 25, 83 – 85
2. Kusumaningtyas E, Astuti E, Darmono Sensitivitas metode bioautografi kontak dan agar overlay dalam penentuan senyawa anti kapang, Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia, 2008 h75-9
3. Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Materia Medika Indonesia. Jilid VI. Jakarta Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan ; 1995, h 15, 324
4. Agus Goeswin. Teknologi Bahan Alam Seri Farmasi Industri 2. ITB. Bandung; 2009. h 31-34.
5. Hadad M., Widayanti, S.M., Brotowali (*Tinospora crispa (L) F Hook and Thoms*), dalam Tumbuhan Obat Indonesia (Pengguna dan Khasiatnya). Pustaka Obor. Jakarta. 2001.
6. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Farmakope Indonesia. Edisi IV. Jakarta: Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan; 1995. h 7, 18, 57,157, 186, 529, 652
7. Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Materia Medika Indonesia edisi IV Jakarta Direktorat Jenderal Pengawasan obat dan makanan; 1995. h 333 – 340
8. Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Sediaan Galenik. Direktorat Jenderal Pengawasan obat dan makanan; 1986. h 10 – 16
9. Syamsudin dkk. Aktivitas Anti Plasmodium dari 2 fase ekstrak *n*-heksan kulit batang asam Kandis (*Garnicia parvifolia* Miq) Majalah Farmasi Indonesia; 200. h 210 – 2015
10. Kardono LBS. Mono graphs and Description Selected, Indonesian Medicinal Plant. h 98 – 103
11. Fansworth NR. Biological and phytochemical screening of plant. J. Pharm Sci; Volume 55; 1966.h 225-65
12. Harbone JB. Metode Fitokimia. Edisi 2. Diterjemahkan oleh Padmawinata K, Sudiro I Bambang ITB; 1987. h 40, 69 -147, 234, 283

13. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Inventaris Obat Indonesia Jilid 1 Jakarta. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Republik Indonesia ;1991. h 292 – 293. h. 57, 71, 156, 163, 191,281
14. Markham KR. Cara Identifikasi flavonoid. Penerbit ITB Bandung; 1988. h 1-3
15. Anggraeningsih T. Penetapan Kandungan Fenol dan Flavonoid Total dari daun sirih hijau dan merah (skripsi). Jakarta Fakultas Farmasi Universitas Pancasila ; 2013. h 8-9
16. Ganiswara SG. Farmakologi dan Terapi edisi IV Jakarta: bagian farmakologi FK UI; 1995. h 571-576
17. 1.Pratiwi ST. Mikrobiologi Farmasi Yogyakarta. Penerbit Airlangga h. 106, 180
18. Henry. *Clinical Microbiology Procedures Handbook* vol.1 American Society For Microbiology, Washington DC ; 1992. h 35-67
19. Jawetz E, Melnick J.L, Aldeberg E.A. Mikrobiologi Kedokteran edisi 20 diterjemahkan oleh Nugroho E, Maulany RF. Jakarta: penerbit buku kedokteran ; 1966. h 143 – 64, 238 – 50
20. Pelezar M.J dan Chan E.C.S. Dasar-dasar Mikrobiologi jilid I dan II penerjemah Hadioetomo RS, Imas T, Tjitrosomo SS, dan Angka SL. UI Press, Jakarta; 1986. h. 82-84, 116-119, 514-531
21. Pelznar M. Dasar – dasar mikrobiologi Jilid I, UI Press, Jakarta ;1986. h 83, 15-141. 508-20.
22. Ganjar I, Sjamsurdzal W, Ariyanti. Mikologi Dasar dan Terapi, Yayasan Obor Indonesia, Jakarta ;2006. h 25-60
23. Varro L, Tylerlyn, R Bendy James, & Roberts Pharmacognosy 7th editon .h 401-408
24. Egon S. Analisis obat secara kromatografi dan mikroskopi. Diterjemahkan oleh Padmawinata K. Bandung: ITB ; 1985. h 5-18, 22-3
25. Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Analisa obat secara kromatografi, Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan ; 1987. h 22-8

26. Gritter RJ, Bobbitt JM, Schwarting AE. Pengantar Kromatografi edisi II Bandung: ITB; 1991. h 107-45, 160-85
27. Raina R. Chemical Analysis of Pesticides Using GC/MS, GC/MS/MS, and LC/MS/MS. *University of Regina, Department of Chemistry & Biochemistry and Trace Analysis Facility*. P. 105-106.
28. Dildar Ahmed1, Ramsha Saeed, Nasir Shakeel, Khaizran Fatima, Aneela Arshad. *Antimicrobial activities of methanolic extract of Carissa opaca roots and its fractions and compounds isolated from the most active ethyl acetate fraction*. *Asian Pac J Trop Biomed* ;2015. h 541–545
29. Ioannis Mourtzinou, Spyros Konteles , Nick Kalogeropoulos , Vaios T. Karathanos. Thermal oxidation of vanillin affects its antioxidant and antimicrobial properties. *Food Chemistry* 114 ;2009. p 791–797\
30. Ngarmsak M, Delaquis P, Toivonen P, Ngarmsak T, Ooraikul B, Mazza G. Antimicrobial activity of vanillin against spoilage microorganisms in stored fresh-cut mangoes. *J Food Prot*; 2006. h 1724-1727
31. Walton NJ, Meyer MJ, Narbad A. Vanillin. *Phytochemistry*; 2003. h 505-508
32. Yff BT, Lindsey KL, Taylor MB, Erasmus DG, Jäger AK. The pharmacological screening of *Pentania prunelloides* and the isolation of the antibacterial compound palmitic acid. *J Ethnopharmacol*. 2002 Jan;79(1):101-7
33. Chifu B. Huang, Yelena Alimova, Taylor M. Myers, Jeffrey L. Ebersole. Short- and medium-chain fatty acids exhibit antimicrobial activity for oral microorganisms. *Archives of Oral Biology*. Volume 56, Issue 7, July 2011, Pages 650–654

Lampiran 1. Determinasi batang brotowali

Lampiran 2. Batang brotowali (*tinospora crispa* L)



Lampiran 3. Peralatan yang digunakan dalam penelitian



Gambar. GCMS



Gambar. Autoclaf



Gambar. Rotari Evaporator

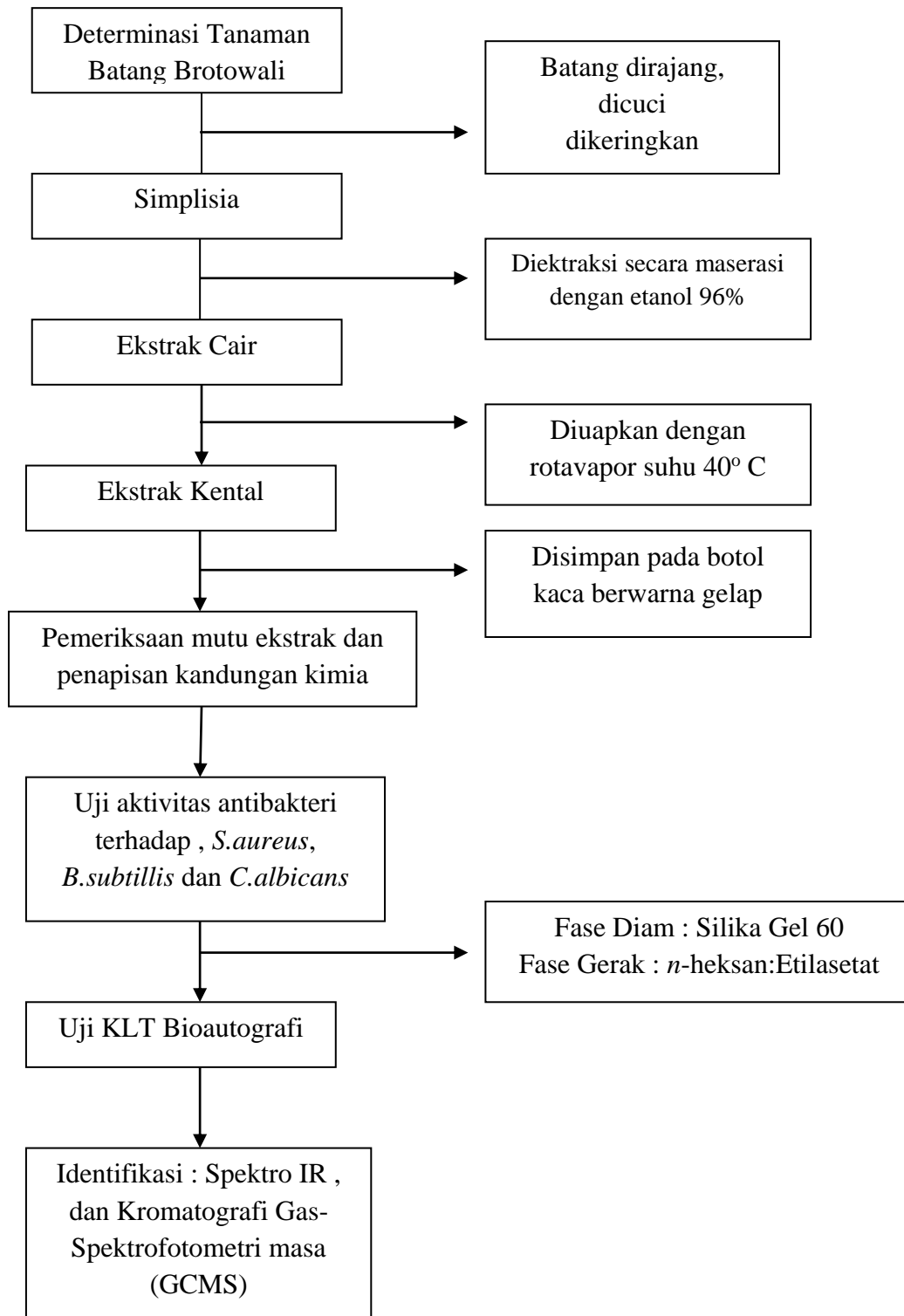


Gambar. Media Agar Miring

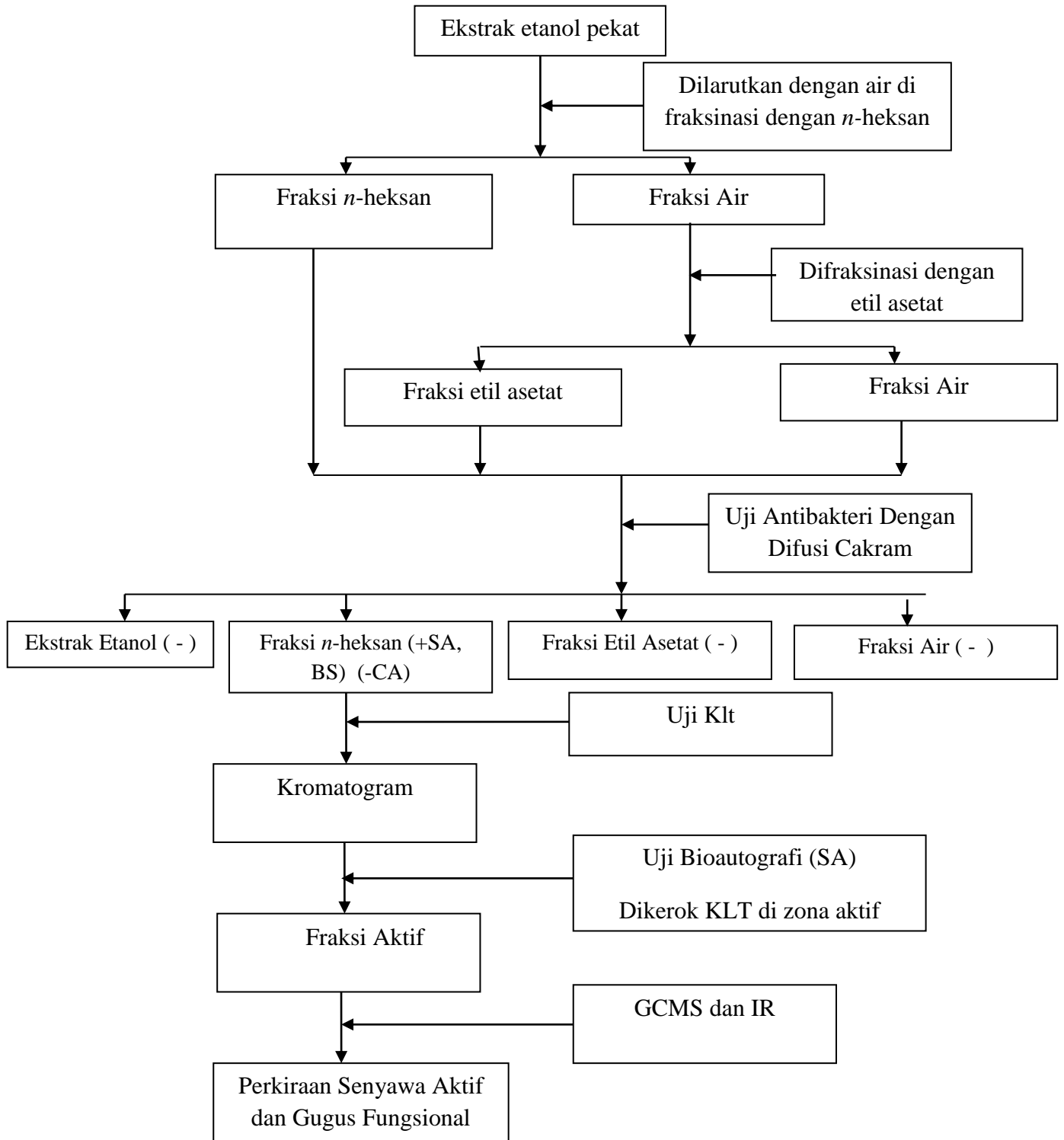


Gambar. Spectrometri Infra Red

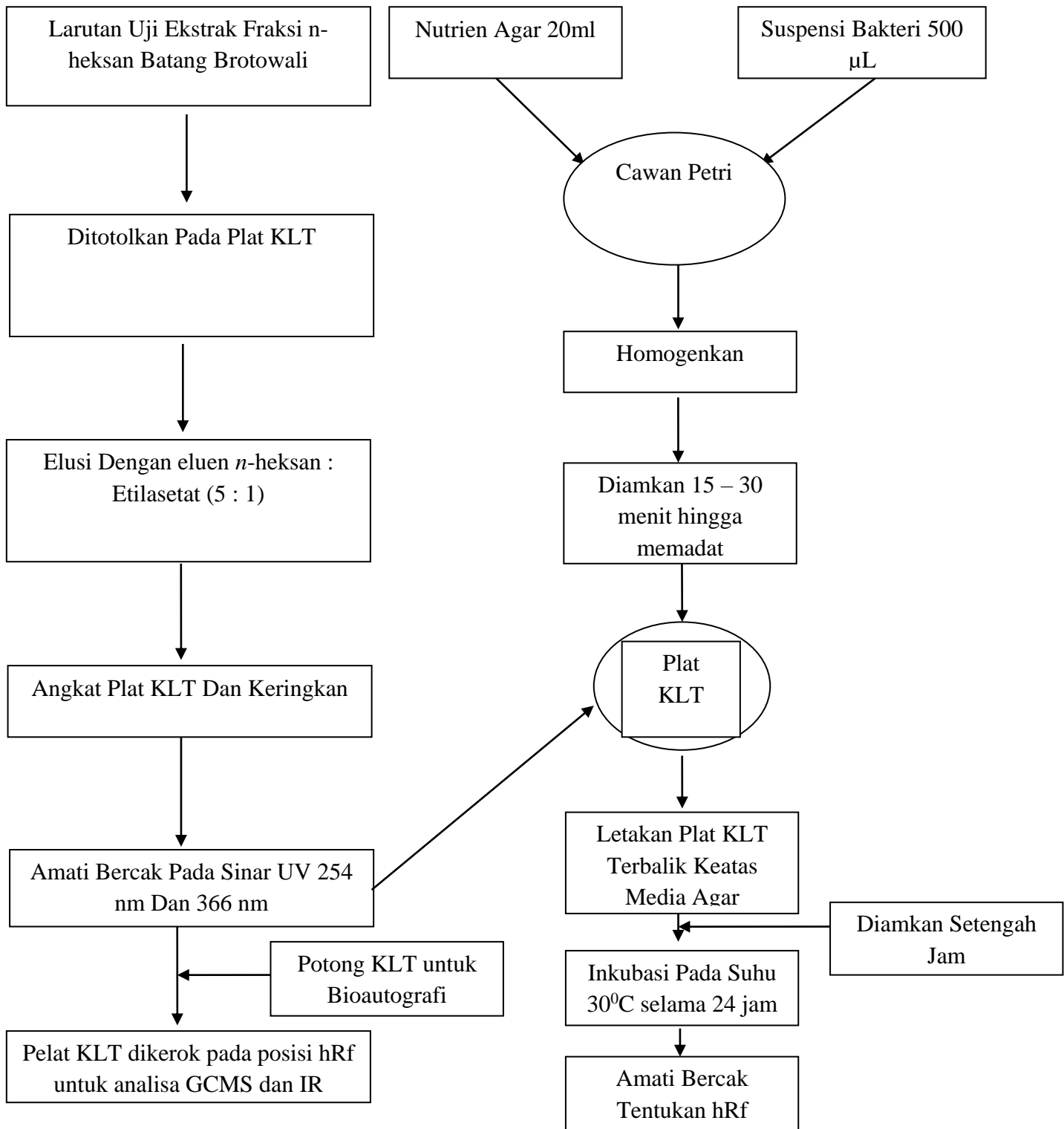
Lampiran 4. Alur kerja penelitian



Lampiran 5. Alur Penelitian fassenasi ekstrak batang brotowali

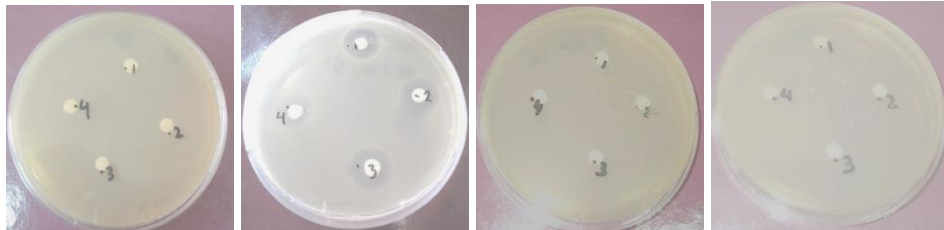


Lampiran 6. Skema Kerja Uji Metode Bioautografi



Lampiran 7. Uji aktivitas bakteri terhadap ekstrak etanol, fase *n*-heksan, fase etil asetat, dan fase air

A. *Staphylococcus aureus*



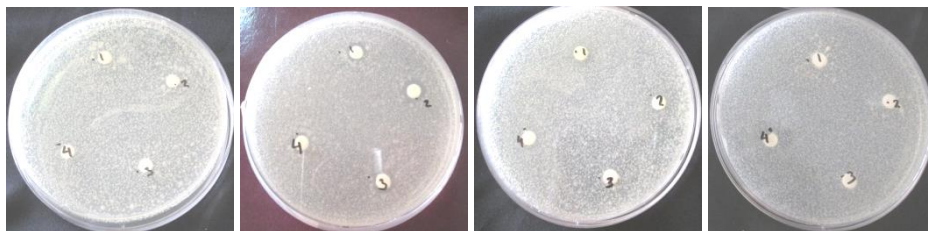
Ekstrak Etanol

Fase *n*-Heksan

Fase Etil Asetat

Fase Air

B. *Bacillus subtilis*



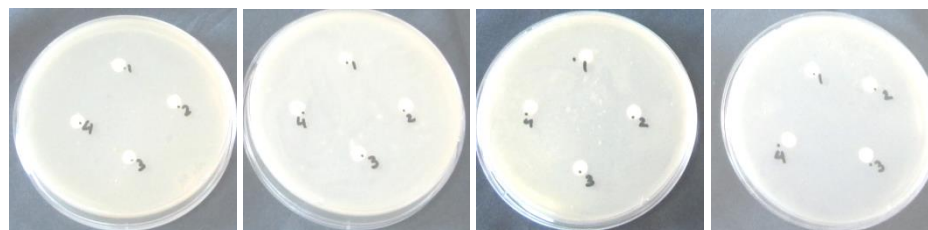
Ekstrak Etanol

Fase *n*-Heksan

Fase Etil Asetat

Fase Air

C. *Candida albicans*



Ekstrak Etanol

Fase *n*- Heksan

Fase Etil Asetat

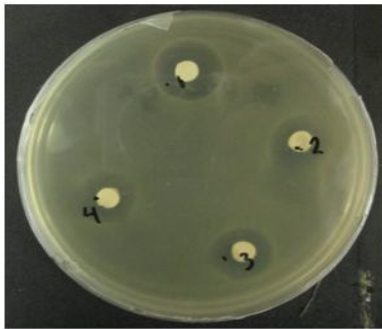
Fase Air

Keterangan

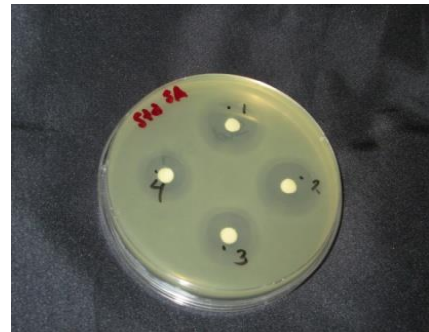
- a. Terjadi daya hambat terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dengan fase *n*-heksan,
- b. terjadi daya hambat terhadap bakteri *Bacillus subtilis* pada fase *n*-heksan
- c. Tidak terjadi daya hambat terhadap *Candida albicans* pada ekstrak etanol, fase *n*-heksan, fase etil asetat dan fase air.

Lampiran 8 Uji aktivitas antibakteri dan standar streptomisin dengan teknik difusi cakram

I. Uji aktivitas bakteri *staphylococcus aureus* dan standar streptomisin



A

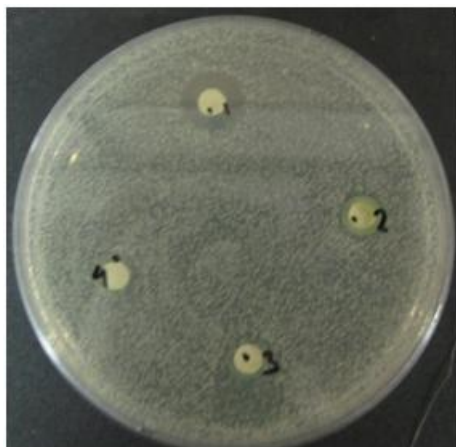


B

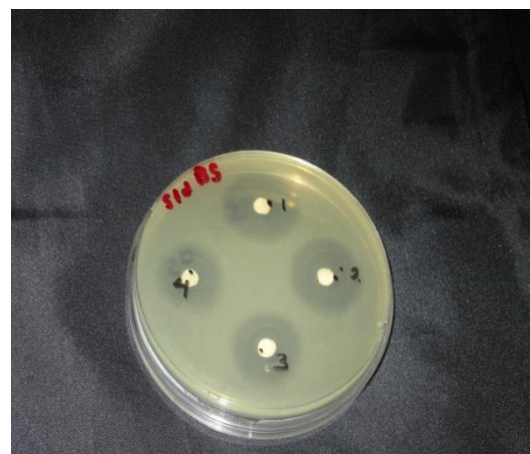
Keterangan :

- A. Daya hambat bakteri SA Fase *n*-heksan (1=10%, 2=5%, 3=2,5%, 4=1,25%)
- B. Daya hambat bakteri SA dengan standar streptomisin (1=1%, 2=0,5%, 3=0,25%, 4=0,125%)

II. Uji aktivitas bakteri *bacillus subtilis* dan standar streptomisin



A



B

Keterangan :

- A. Daya hambat bakteri BS Fase *n*-heksan (1=10%, 2=5%, 3=2,5%, 4=1,25%)
- B. Daya hambat bakteri BS dengan standar streptomisin (1=1%, 2=0,5%, 3=0,25%, 4=0,125%)

III. Uji aktivitas *Candida albicans* dan standar streptomisin



A



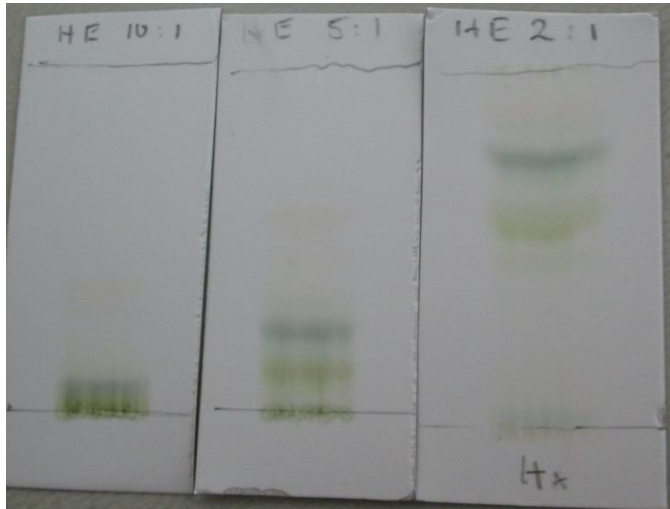
B

Keterangan :

Tidak ada daya hambat baik pada standar maupun zat uji.

Lampiran 9. Hasil Pola Kromatogram Fase *n*-heksan

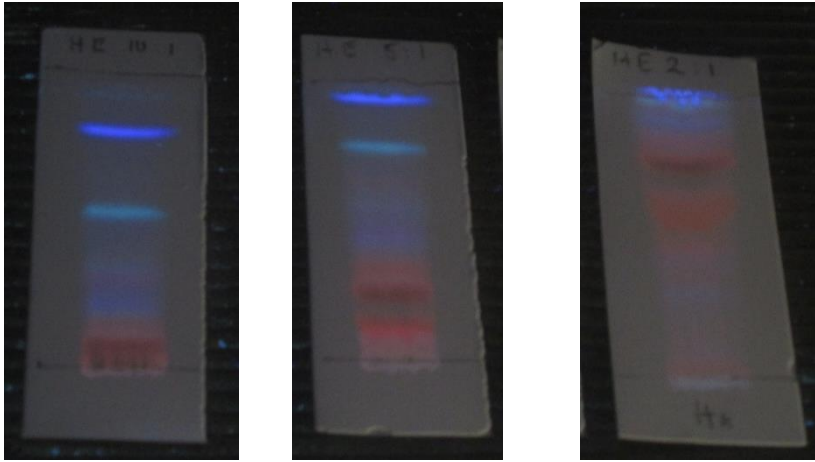
TLC Silica gel 60



UV 254



UV 366



Keterangan:

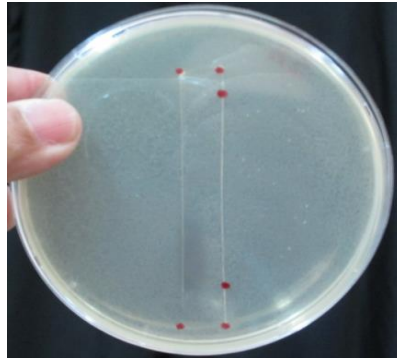
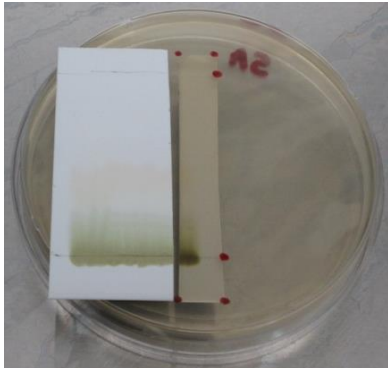
Jarak rambat = 8 cm

Fase diam = silika gel 60

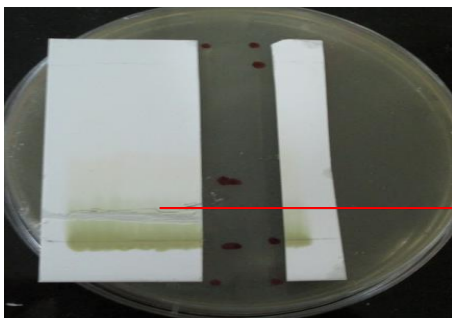
Fase gerak = *n*-heksan:etil asetat = 10:1, 5:1, 2:1

Jumlah totalan = 20 μ l

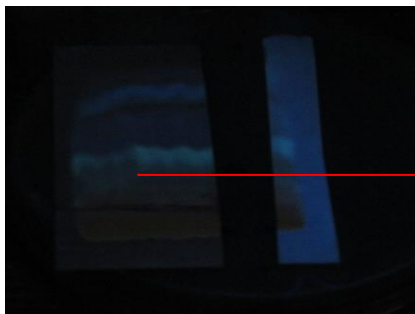
Lampiran 10. hasil uji aktivitas antibakteri *staphylococcus aureus* fase n-hexan dengan metode bioautografi



Zona bening (Zona hambat)

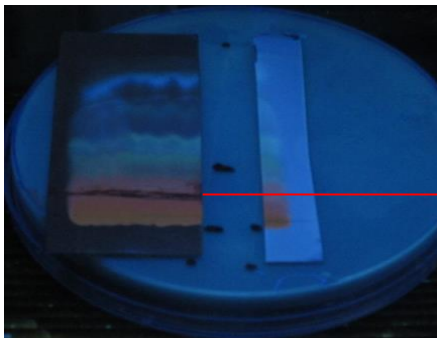


Sinar tampak (visible)



Sinar UV 254 nm

Daerah yang dikerok
untuk dianalisa dengan
GCMS dn IR



Sinar UV 366 nm

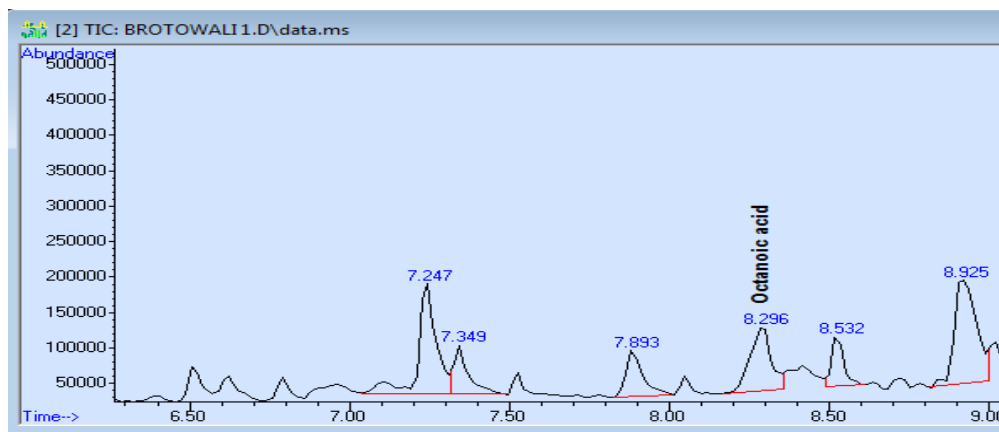
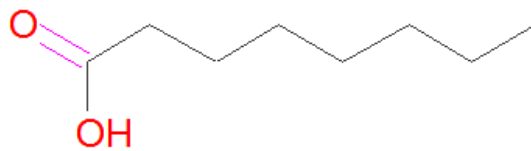
Lampiran 11. Pola Kromatogram Octanoic acid

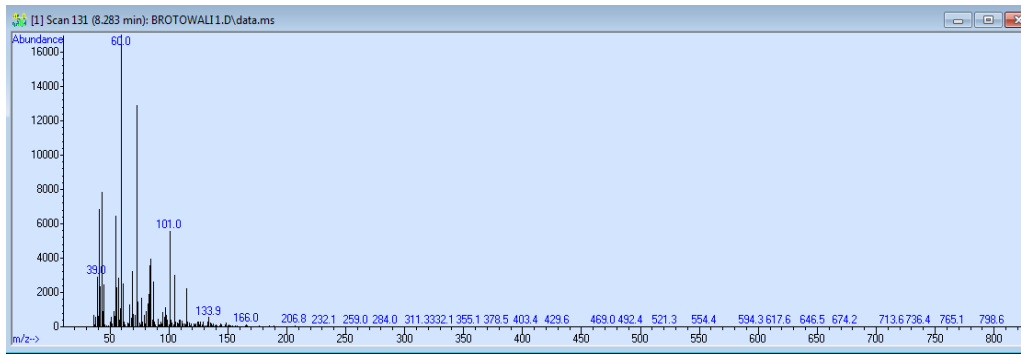
CAS Number 000124-07-2

Entry Number 56971

Molecular Formula C₈H₁₆O₂

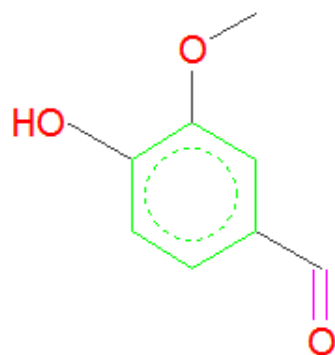
Molecular Weight 144.12

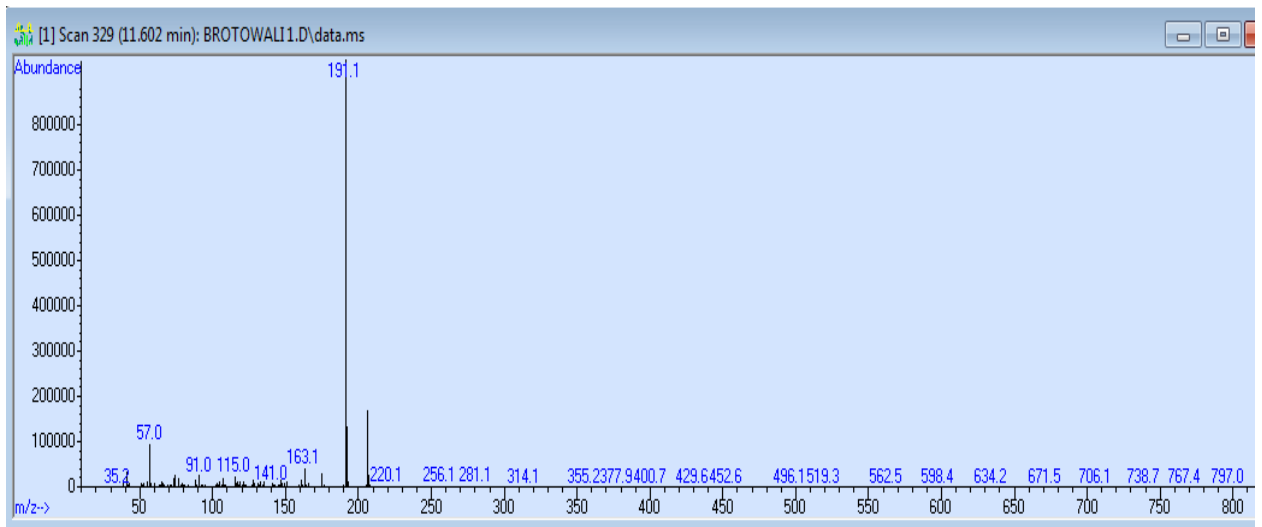
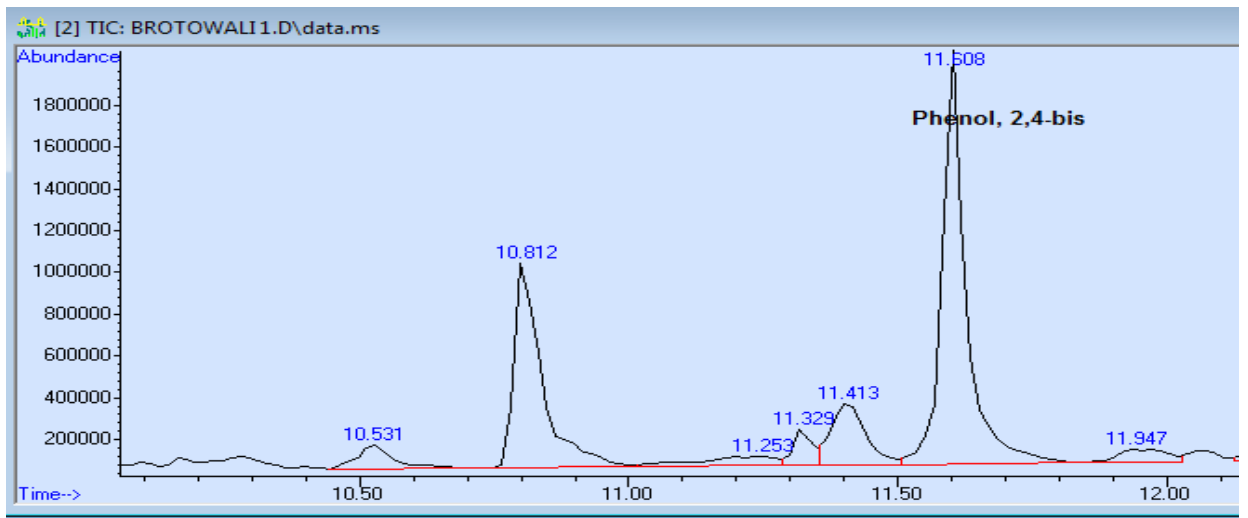




Lampiran 12. Pola Kromatogram Benzaldehide, 4-hydroxy-3-methoxy-Vanillin

CAS Number	000121-33-5
Retensi	10,814
Area	7,77
Entry Number	69834
Molecular Formula	C ₈ H ₈ O ₃
Misc Information	SpectrumID: 1148757; Source: K-102-1515-2; QI: 950; NBS#: 290719
Match Quality	93
Molecular Weight	152.05





Lampiran 13. Kromatogram Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)- Phenol, 2,4-di-tert-butyl

CAS Number 000096-76-4

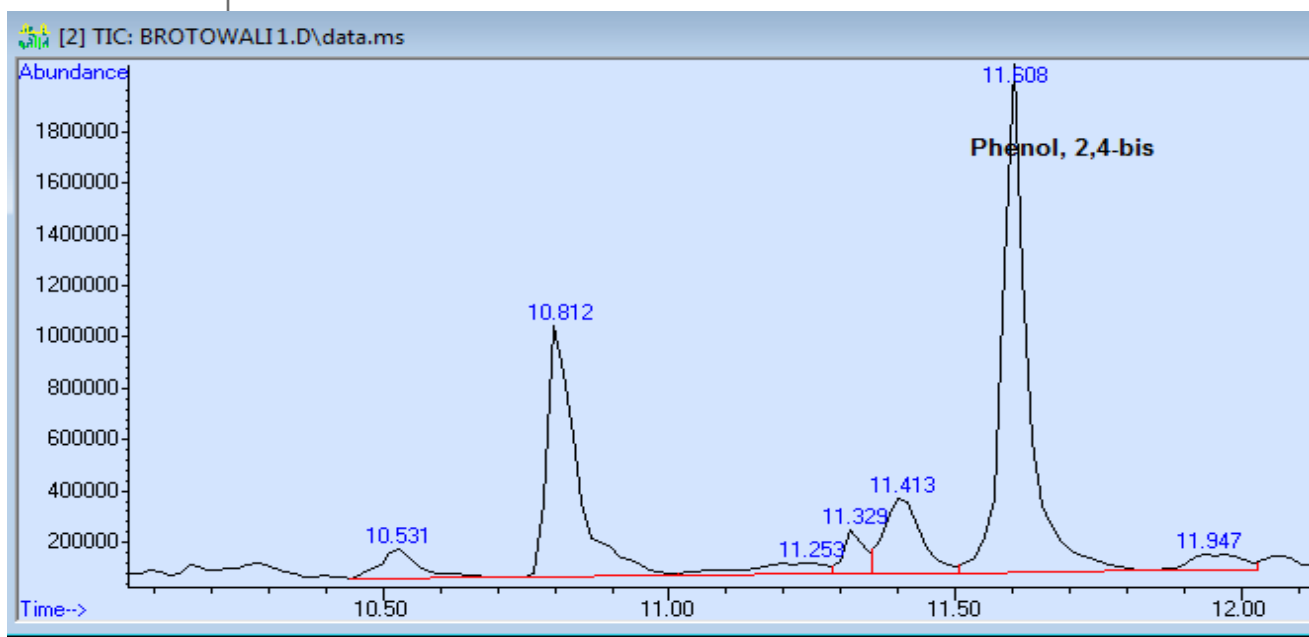
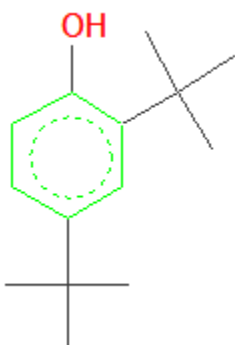
Entry Number 199030

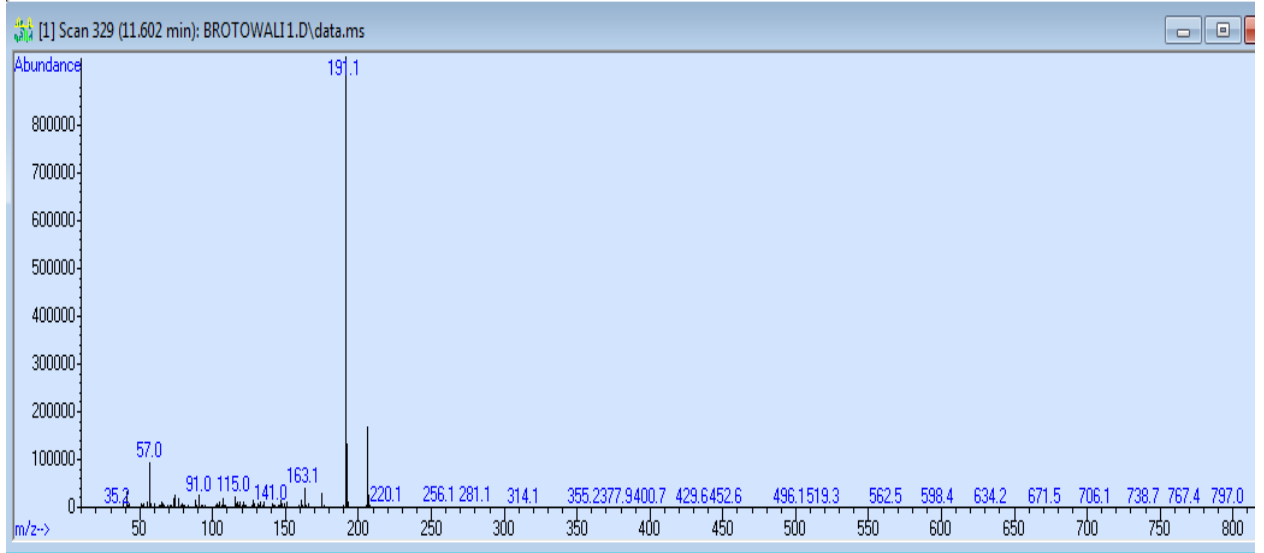
Molecular Formula C₁₄H₂₂O

Misc Information SpectrumID: 2238732; Source: NS-23-8732-0; QI: 893;
NIST#: 133233

Match Quality 95

Molecular Weight 206.17





Lampiran 14. Pola Kromatogram Hexadecanoic acid Palmitic acid

CAS Number 000057-10-3

Retensi 14,871

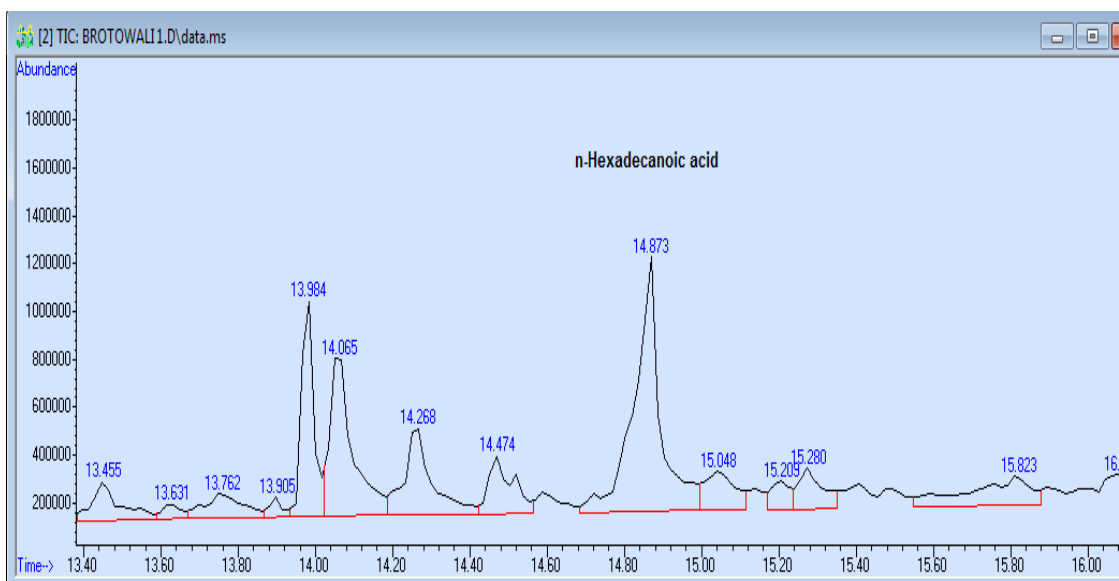
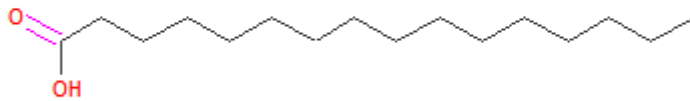
Area 10.55

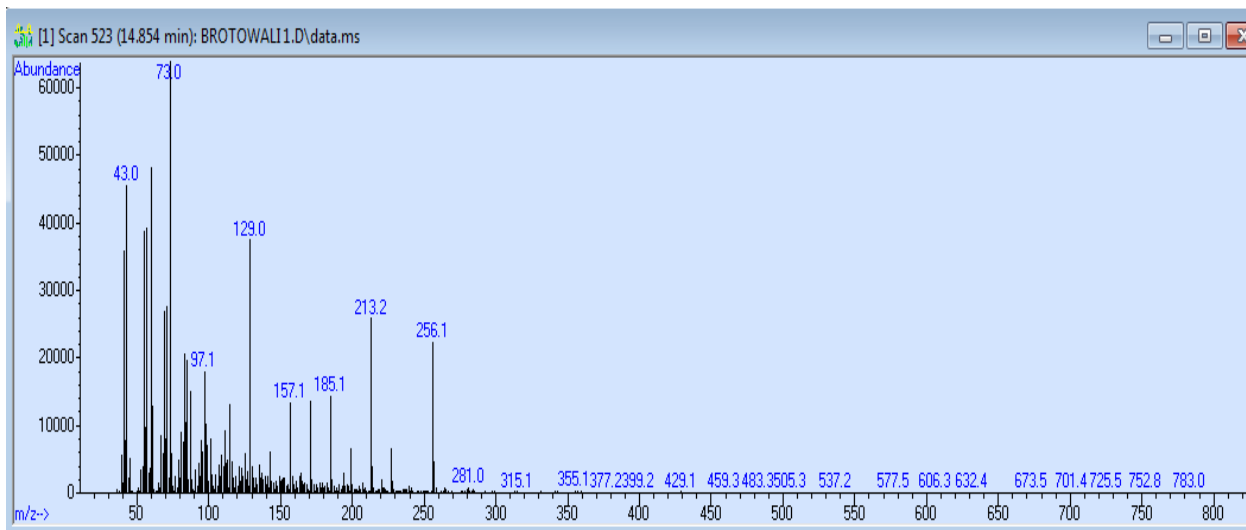
Entry Number 342247

Molecular Formula C16H32O2

Match Quality 99

Molecular Weight 256.24





**Lampiran 15. Pola Kromatogram Phenol, 4,4'-(1-methylethylidene)bis-
Phenol, 4,4'-isopropylidenedi**

CAS Number 000080-05-7

Entry Number 261963

Molecular Formula C₁₅H₁₆O₂

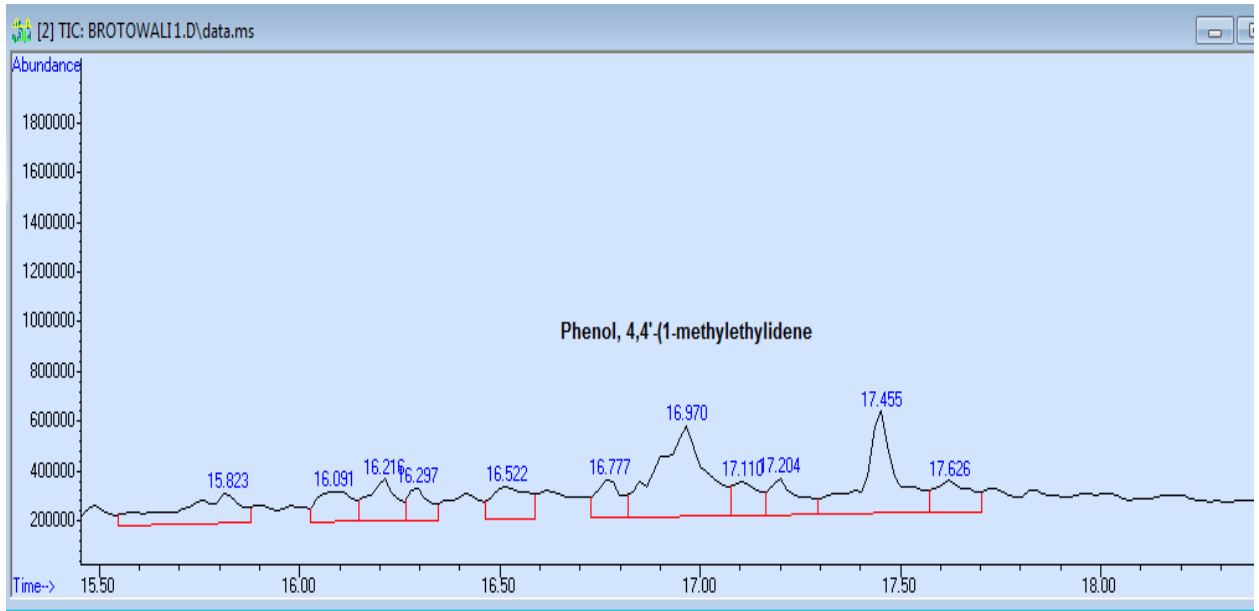
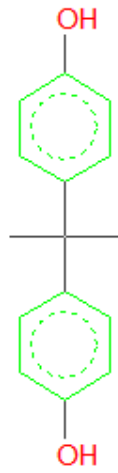
Misc Information SpectrumID: 2169396; Source: NS-16-9396-0; QI: 886;
NIST#: 291215

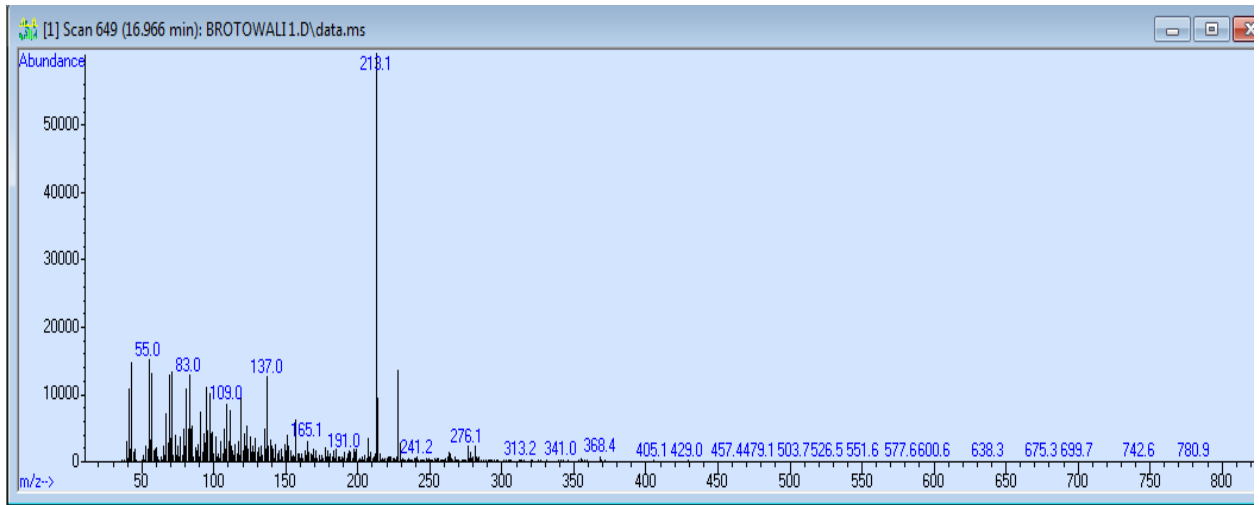
Match Quality 96

Company ID 261963

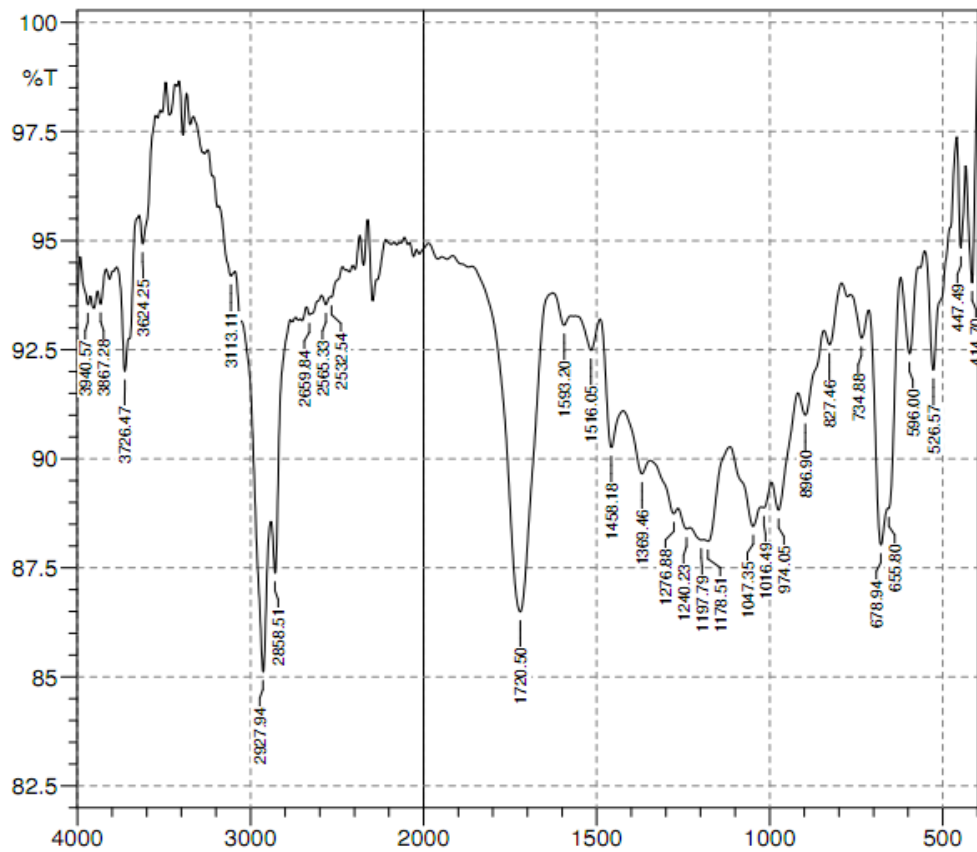
User Index 2022

Molecular Weight 228.12





Lampiran 16. Hasil uji spektrofotometri IR fase *n*-heksan



Keterangan:

Diperkirakan terdapat gugus – gugus fungsi:

1. alkena (3000 cm⁻¹)
2. C-O (± 1660 - 1820 cm⁻¹)
3. C-H Strech (2800 – 3000 cm⁻¹)
4. O-H (2700-3800)