



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI SENYAWA YANG MEMILIKI AKTIVITAS  
ANTI-*Propionibacterium acne*, ANTI-*Staphylococcus aureus* DARI DAUN  
MIMBA (*Azadirachta indica* A. Juss)**

**TESIS**

**ANNYSA ELLYCORNIA SILVYANA  
2006508463**

**FAKULTAS FARMASI  
PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU KEFARMASIAN  
DEPOK  
2022**





**UNIVERSITAS INDONESIA**

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI SENYAWA YANG MEMILIKI AKTIVITAS  
ANTI-*Propionibacterium acne*, ANTI-*Staphylococcus aureus* DARI DAUN  
MIMBA (*Azadirachta indica* A. Juss)**

**TESIS**

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister Farmasi**

**ANNYSA ELLYCORNIA SILVYANA  
2006508463**

**FAKULTAS FARMASI  
PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU KEFARMASIAN  
DEPOK  
2022**

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

**Tesis ini adalah hasil karya saya sendiri,  
dan semua sumber baik yang dikutip maupun  
dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.**

**Nama : Annysa Ellycornia Silvyana**

**NPM : 2006508463**

**Tanda Tangan :** 

**Tanggal : 18 Juli 2022**






## HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :

Nama : Annysa Ellycornia Silvyana  
NPM : 2006508463  
Program Studi : Magister Ilmu Kefarmasian  
Judul Tesis : Isolasi Dan Karakterisasi Senyawa Yang Memiliki Aktivitas Anti-  
*Propionibacterium acne*, Anti-*Staphylococcus aureus* Dari Daun  
Mimba (*Azadirachta indica* A. Juss)

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Farmasi dari Program Studi Magister Ilmu Kefarmasian, Fakultas Farmasi, Universitas Indonesia.

## DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Prof. Dr. Berna Elya, M.Si., Apt (  )  
Pembimbing II: Ratika Rahmasari, M.Pharm.Sc., Ph.D., Apt (  )  
Penguji I : Dr. Herman Suryadi, M.S., Apt (  )  
Penguji II : Roshamur Cahyan Forestrania, M.Sc., Ph.D., Apt (  )  
Penguji III : Prof. Dr. Hayun, M.Si., Apt (  )

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 18 Juli 2022

## KATA PENGANTAR

Puji Syukur penulis panjatkan kehadiran Allah Subhanahuwata'ala, Tuhan Yang Maha Esa, karena atas berkat, rahmat serta karuniaNya sehingga penulis dapat menyelesaikan seluruh rangkaian proses penelitian dan penulisan tesis yang berjudul "Isolasi Dan Karakterisasi Senyawa Yang Memiliki Aktivitas Anti-*Propionibacterium acne*, Anti-*Staphylococcus aureus* Dari Daun Mimba (*Azadirachta indica* A. Juss)".

Penulisan tesis ini dilakukan untuk memenuhi salah satu syarat dalam mencapai gelar Magister Farmasi pada Fakultas Farmasi Universitas Indonesia. Penulis menyadari bahwa tesis ini tidak mungkin dapat diselesaikan tanpa bantuan, bimbingan dan dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Berna Elya, M.Si., Apt dan Ratika Rahmasari, M.Pharm.Sc., Apt., Ph.D selaku dosen pembimbing I dan dosen Pembimbing II yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan dan membantu penulis dalam penyusunan tesis ini;
2. Prof. Arry Yanuar M.Si., Apt., selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Indonesia atas dukungan dan kesempatannya;
3. Dr. Herman Suryadi, M.Si., Apt selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Kefarmasian dan seluruh dosen serta seluruh staf Fakultas Farmasi Universitas Indonesia atas ilmu serta bantuan yang telah diberikan;
4. Suami saya, Syamsul Azis, anak saya Maulana Zidane Alfarizi, Sulthan Zayn Malik dan kedua orang tua saya, Ayahanda Mas Sugiyanto dan (almh) Ibunda Yuyun Junaeni, Mertua saya Ibunda Sri Sutarni, serta adik-adik saya Maya, Reni dan Deri atas segala doa, bantuan, dan dukungan yang diberikan;
5. Partner saya dalam proses penelitian ini, Ibu Dessy, Bannan, Tari, Sabila, Bapak Syamsu yang telah memberikan bantuan, dukungan, serta semangat dalam proses penelitian hingga penyusunan tesis ini;
6. Seluruh rekan-rekan dan staf di Laboratorium Penelitian Fitokimia Dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Farmasi Universitas Indonesia, serta seluruh rekan Magister Farmasi Universitas Indonesia atas bantuan dan dukungannya selama proses perkuliahan dan penelitian;

7. Seluruh pihak yang tidak dapat disebutkan satu-persatu yang telah memberikan bantuan, semangat, dukungan, serta doanya;

Akhir kata, saya berharap Allah Subhanahuwata'ala berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga tesis ini dapat memberikan manfaat dalam pengembangan ilmu pengetahuan.

Penulis,

2022

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR  
UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Annysa Ellycornia Silvyana  
NPM : 2006508463  
Program Studi : Ilmu Kefarmasian  
Departemen : Bioteknologi dan Bahan Alam Farmasi  
Jenis karya : Tesis

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty- Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul:

**Isolasi Dan Karakterisasi Senyawa Yang Memiliki Aktivitas Anti-*Propionibacterium acne*, Anti-*Staphylococcus aureus* Dari Daun Mimba (*Azadirachta indica* A. Juss)**

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/ formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 18 Juli 2022

Yang menyatakan



Annysa Ellycornia Silvyana

## ABSTRAK

Nama : Annysa Ellycornia Silvyana  
Program Studi : Ilmu Kefarmasian  
Judul : Isolasi Dan Karakterisasi Senyawa Yang Memiliki Aktivitas Anti-*Propionibacterium acne*, Anti-*Staphylococcus aureus* Dari Daun Mimba (*Azadirachta indica* A. Juss)  
Pembimbing : Prof. Dr. Berna Elya, M.Si., Apt.  
Ratika Rahmasari, M.Pharm.Sc., Apt., Ph.D

Jerawat adalah penyakit kulit yang muncul ketika timbunan lemak berlebih menyumbat pori-pori kulit, menyebabkan tumbuhnya bakteri penyebab jerawat dan merangsang peradangan. *Azadirachta indica* merupakan tanaman obat yang dapat digunakan sebagai antibakteri. Berdasarkan beberapa penelitian daun mimba telah diketahui memiliki aktivitas antibakteri, antijamur, antihipertensi, antijamur, antihiperlipidemia, antioksidan dan aktivitas biologis lainnya. Pada penelitian sebelumnya telah diketahui ekstrak etanol daun mimba menunjukkan aktivitas terhadap *P. acne*. Belum ada penelitian yang melakukan dari ekstraksi hingga isolasi dan karakterisasi senyawa kimia. Penelitian ini bertujuan untuk identifikasi ekstrak, fraksi dan isolat paling aktif dari daun mimba serta mengidentifikasi elusidasi senyawa aktif tersebut. Ekstraksi dilakukan secara bertingkat (n-heksan, etil asetat, metanol) dan dilanjutkan uji aktivitas bakteri *P.acne*. Ekstrak teraktif yang di dapat dilakukan fraksinasi dengan kromatografi kolom dan di uji aktivitas bakteri *P.acne*, fraksi teraktif yang didapat dilanjut pemurnian isolat dengan kromatografi kolom dan rekristalisasi, serta uji aktivitas bakteri *P.acne*, *S.aureus* dan *S.epidermidis*. Isolat teraktif yang didapat diidentifikasi menggunakan spektrometri FTIR, GCMS, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR dan DEPT. Hasil ekstraksi bertingkat menunjukkan bahwa ekstrak n-heksan (ENH) yang telah diuji anti-*P.acne* memiliki aktivitas pada konsentrasi 5% dapat menghambat pertumbuhan *P.acne*, dilanjutkan dengan ekstrak etil asetat (EEA) pada konsentrasi 10% dapat menghambat pertumbuhan *P.acne*. Kedua ekstrak tersebut kemudian difraksinasi dengan metode kromatografi kolom, menghasilkan 8 fraksi dari ENH, didapatkan fraksi teraktif adalah fraksi G dan 6 fraksi dari EEA, didapatkan fraksi teraktif adalah fraksi L. Selanjutnya dilakukan isolasi terhadap fraksi G didapat 1 isolat teraktif dan fraksi L didapat 1 isolat teraktif. Hasil identifikasi senyawa disimpulkan isolat 1 yang didapat dari ekstrak n-heksan adalah Ergosta-5,22-diene-2,3,14-triol dengan nilai penghambatan 50 ppm pada bakteri *P.acne* dan *S.aureus*, dan isolat 3 yang didapat dari ekstrak etil asetat adalah Stigmasterol dengan nilai penghambatan 100 ppm pada bakteri *P.acne* dan *S.aureus*.

Kata kunci: *Azadirachta indica*, ekstrak n-heksan, *Propionibacterium acne*,  
Senyawa Kimia

## ABSTRACT

Name : Annysa Ellycornia Silvyana  
Study Program : Pharmaceutical Sciences  
Title : Isolation and Characterization of Potential Anti-*Propionibacterium acne*, Anti-*Staphylococcus aureus* Activity Compound From *Azadirachta indica* Leave  
Counsellor(s) : Prof. Dr. Berna Elya, M.Si., Apt.  
Ratika Rahmasari, M.Pharm.Sc., Apt., Ph.D

Acne is a skin surface disease that appears when excessive fat deposits clogged the skin pores, causing growth of acne-causing bacteria and stimulates inflammation. *Azadirachta indica* is a medicinal plant which empirically used as antibacterial. Based on several studies, neem leaves have been known to have antibacterial, antifungal, antihypertensive, antifungal, antihyperglycemic, antioxidant and other biological activities. In previous studies, it was known that the ethanolic extract of neem leaves showed activity against *P. acne*. No research has been conducted from extraction to isolation and characterization of chemical compounds. *A. indica* leaves has been reported to exhibit activity against *P. acne* but are limited to ethanol extract. This study aims to identify the most active extracts, fractions and isolates from neem leaves and to identify these active compounds. Extraction was carried out in stages (n-hexane, ethyl acetate, methanol) and the activity of *P.acne* was tested. The most active extracts were fractionated using column chromatography and tested for *P.acne* bacteria activity, the most active fractions obtained were further purified by column chromatography and recrystallization, as well as activity tests for *P.acne*, *S.aureus* and *S.epidermidis* bacteria. The most active isolates obtained were identified using FTIR, GCMS, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, and DEPT spectrometry. The results of the stratified extraction showed that the n-hexane extract (ENH) had the antibacterial activity of *P.acne* at a concentration of 5% which could inhibit the growth of *P.acne*, followed by ethyl acetate extract (EEA) at a concentration of 10% which inhibited the growth of *P.acne*. The two extracts were then fractionated by column chromatography method, producing 8 fractions of ENH, obtained the most active fraction was fraction G and 6 fractions from EEA, obtained the most active fraction was fraction L. Then isolated the fraction G obtained 1 active isolate and fraction L obtained 1 active isolate. The results of the identification of compounds concluded that isolate 1 obtained from the n-hexane extract was Ergosta-5,22-diene-2,3,14-triol with an inhibitory value of 50 ppm on *P.acne* and *S.aureus* bacteria, and isolate 3 obtained from the ethyl acetate extract was Stigmasterol with an inhibitory value of 100 ppm on *P.acne* and *S.aureus* bacteria.

**Key words:** *Azadirachta indica*, hexane extract, *Propionibacterium acne*,  
Chemical content

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS .....	ii
HALAMAN PENGESAHAN .....	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS .....	vi
ABSTRAK .....	vii
ABSTRACT .....	viii
DAFTAR ISI .....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR TABEL .....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN .....	xv
DAFTAR SINGKATAN.....	xvi
<b>BAB I PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
I.1 Latar Belakang .....	1
I.2 Rumusan Masalah .....	2
1.3 Tujuan Penelitian.....	2
1.4 Manfaat Hasil Penelitian .....	3
1.5 Hipotesis .....	3
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>4</b>
2.1 <i>Azadirachta indica</i> A. Juss .....	4
2.1.1 Klasifikasi.....	4
2.1.2 Nama Tanaman .....	4
2.1.3 Morfologi.....	5
2.1.4 Manfaat dan Efek Farmakologi .....	6
2.1.5 Kandungan Kimia.....	6
2.2 Simplisia .....	7
2.3 Ekstrak .....	8
2.4 Metode Ekstraksi .....	10
2.4.1 Ekstraksi .....	10

2.4.2 Metode Ekstraksi Konvensional.....	10
2.4.3 Metode Ekstraksi Modern .....	12
2.5 Anatomi dan Fisiologi Kulit .....	15
2.6 Acne vulgaris.....	18
2.6.1 Etiologi dan Faktor Resiko .....	19
2.7 Bakteri .....	20
2.7.1 Pertumbuhan Bakteri .....	20
2.7.2 Morfologi dan Klasifikasi <i>Propionibacterium acnes</i> .....	22
2.7.3 Morfologi dan Klasifikasi <i>Staphylococcus aureus</i> .....	23
2.7.4 Morfologi dan Klasifikasi <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	24
2.8 Antibakteri.....	25
2.9 Uji Aktivitas Antibakteri .....	26
2.9.1 Metode Difusi.....	26
2.9.2 Metode Dilusi.....	27
2.10 Antibakteri Pembanding.....	28
2.11 Metode Isolasi dan Pemurnian .....	29
2.12 Rekrystalisasi.....	30
2.13 Karakterisasi senyawa murni.....	31
2.13.1 Spektrofotometer UV-VIS .....	31
2.13.2 Spektrofotometer Inframerah .....	31
2.13.3 Spektrometer Massa .....	32
2.13.4 Spektrometer Resonansi Magnet Inti .....	33
<b>BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN .....</b>	<b>35</b>
3.1. Waktu dan Tempat Penelitian.....	35
3.2. Bahan.....	35
3.2.1 Bahan tanaman .....	35
3.2.2 Bahan Kimia.....	35
3.2.3 Bahan Bakteri.....	35
3.3. Peralatan .....	35
3.4. Prosedur Penelitian .....	36
3.4.1 Penyiapan Simplisia .....	36
3.4.2 Pembuatan Ekstrak.....	36

3.5 Uji Antibakteri.....	36
3.5.1 Sterilisasi Alat .....	36
3.5.2 Pembuatan Media .....	37
3.5.3 Penapisan Bakteri .....	37
3.5.4 Peremajaan Bakteri.....	37
3.5.5 Pembuatan Suspensi Bakteri .....	38
3.5.6 Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum.....	38
3.5.7 Penentuan Konsentrasi Bunuh Minimum .....	39
3.6 Fraksinasi.....	39
3.6.1 Fraksinasi Ekstrak N-Heksan .....	40
3.6.2 Fraksinasi Ekstrak Etil Asetat .....	40
3.7 Isolasi dan pemurnian.....	41
3.8 Identifikasi Senyawa.....	42
<b>BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>44</b>
4.1 Ekstrak Daun Mimba.....	44
4.2 Penapisan gram.....	46
4.3 Pengujian Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Mimba.....	47
4.3.1 Pengujian Nilai KHM Ekstrak Daun Mimba .....	47
4.3.2 Pengujian Nilai KBM Ekstrak Daun Mimba .....	47
4.4. Fraksinasi Ekstrak Daun Mimba .....	49
4.4.1 Pengujian Nilai KHM Fraksi Ekstrak N-Heksan .....	50
4.4.2 Pengujian Nilai KBM Fraksi Ekstrak N-Heksan .....	52
4.4.3 Pengujian Nilai KHM Fraksi Ekstrak Etil Asetat.....	53
4.4.4 Pengujian Nilai KBM Fraksi Eksstrak Etil Asetat .....	54
4.5. Isolasi dan pemurnian Senyawa .....	54
4.5.1 KLT Isolat 1 .....	54
4.5.2 KLT Isolat 2 .....	55
4.5.3 KLT Isolat 3 .....	56
4.6. Uji Aktivitas Isolat .....	57
4.7 Penentuan Struktur Molekul.....	60
4.7.1 Data Hasil Pengukuran Spektrofotometri IR Senyawa 1 .....	60
4.7.2 Daata Hasil Pengukuran GCMS Senyawa Isolat 1.....	60

4.7.3 Data Hasil Pengukuran NMR Senyawa Isolat 1 .....	60
4.7.4 Data Hasil Pengukuran Spektrofotometri IR Senyawa 3 .....	64
4.7.5 Data Hasil Pengukuran GCMS Senyawa Isolat 3.....	64
4.7.6 Data Hasil Pengukuran NMR Senyawa Isolat 3 .....	64
<b>BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>67</b>
5.1 Kesimpulan.....	67
5.2 Saran .....	67
<b>DAFTAR REFERENSI.....</b>	<b>68</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>74</b>

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Tanaman Mimba (Sumber : Dokumen Pribadi) .....	5
Gambar 2.2. Daun Mimba (Dokumen Pribadi) .....	6
Gambar 2.3 Sistem Ekstraksi <i>Ultrasound Assisted Extraction</i> (UAE) .....	13
Gambar 2.4 Sistem Ekstraksi <i>Microwave Assisted Extraction</i> (MAE) .....	14
Gambar 2.5 Skema metode <i>Supercritical Fluid Extraction</i> (SFE) .....	15
Gambar 2.6 Struktur kulit (Kalangi, 2014).....	16
Gambar 2.7 Bakteri <i>Propionibacterium acne</i> (Dokumen Pribadi).....	22
Gambar 2.8 Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> (Dokumen Pribadi).....	23
Gambar 2.9 Bakteri <i>Staphylococcus epidermidis</i> (Dokumen Pribadi).....	24
Gambar 2.10 Rumus Bangun Klindamisin hidroklorida (Indonesia, 2014).....	28
Gambar 2.11 Spektrum Massa (Jenie, U. A., dkk., 2014).....	33
Gambar 3.1 Bagan fraksinasi dan isolasi senyawa dari daun mimba.....	42
Gambar 4.1 Hasil Pewarnaan Gram pada perbesaran 100x Bakteri <i>P.acne</i> (A), Bakteri <i>S.aureus</i> (B), Bakteri <i>S.epidermidis</i> (C).....	45
Gambar 4.2 Hasil KLT senyawa isolat 1 di bawah lampu UV 254 .....	54
Gambar 4.3 Hasil KLT senyawa isolat 2 di bawah lampu UV 356 .....	55
Gambar 4.4 Hasil KLT senyawa isolat 3 dibawah lampu UV 254 dan 356 .....	55
Gambar 4.5 Struktur Kimia Korelasi HMBC dan HMQC Senyawa Isolat 1 .....	62
Gambar 4.6 Struktur Kimia Senyawa Isolat 1 (Ergosta-5,22-diene-2,3,14-triol). 63	
Gambar 4.7 Struktur Kimia Senyawa Isolat 3 (Stigmasterol) .....	66

## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Kategori Daya Hambat Bakteri .....	27
Tabel 4.1 Hasil Berat dan Rendemen Simplisia Daun Mimba.....	44
Tabel 4.2 Perbandingan Proses ekstraksi.....	45
Tabel 4.3 Hasil berat dan rendemen ekstrak daun mimba.....	45
Tabel 4.4 Hasil uji KHM pada bakteri <i>P.acne</i> (Eksperimen ke 1 dan 2).....	47
Tabel 4.5 Hasil Uji Aktivitas KBM (Eksperimen ke 1).....	48
Tabel 4.6 Hasil Uji Aktivitas KBM (Eksperimen ke 2).....	48
Tabel 4.7 Hasil Fraksinasi Ekstrak N-Heksan Daun Mimba.....	50
Tabel 4.8 Hasil Uji KHM Pada Bakteri <i>P.acne</i> (Eksperimen ke 1 dan 2).....	50
Tabel 4.9 Hasil Uji KBM Fraksi Ekstrak N-Heksan (Eksperimen ke 1).....	51
Tabel 4.10 Hasil Uji KBM Fraksi Ekstrak N-Heksan (Eksperimen ke 2).....	51
Tabel 4.11 Hasil Fraksinasi Fraksi Ekstrak Etil Asetat Daun Mimba.....	52
Tabel 4.12 Hasil uji KHM pada <i>P.acne</i> (Eksperimen ke 1).....	52
Tabel 4.13 Hasil Uji KHM pada <i>P.acne</i> (Eksperimen Ke 2).....	53
Tabel 4.14 Hasil Uji KBM pada <i>P.acne</i> (Eksperimen Ke 1).....	53
Tabel 4.15 Hasil Uji KBM pada <i>P.acne</i> (Eksperimen Ke 2).....	54
Tabel 4.16 Hasil Uji KHM Isolat pada <i>P.acne</i> (Eksperimen ke-1 dan 2).....	56
Tabel 4.17 Hasil Uji KBM Isolat pada <i>P.acne</i> (Eksperimen ke-1 dan 2).....	56
Tabel 4.18 Hasil Uji KHM Isolat bakteri <i>S.aureus</i> (eksperimen ke-1 dan 2).....	57
Tabel 4.19 Hasil Uji KBM Isolat pada <i>S.aureus</i> (Eksperimen ke-1 dan 2).....	57
Tabel 4.20 Hasil Uji KHM Isolat bakteri <i>S.epidermidis</i> (eksperimen ke-1 dan 2).....	58
Tabel 4.21 Data hasil NMR Isolat 1 dibandingkan dengan Literatur.....	62
Tabel 4.22 Nilai Geseran Kimia H dan C NMR pada senyawa isolat 3 dan perbandingan dengan literatur Stigmasterol.....	65

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Bagan Penelitian .....	85
Lampiran 2. Surat Determinasi Mimba.....	86
Lampiran 3. Sertifikat Pengujian Klindamisin Hidroklorida .....	87
Lampiran 4. Sertifikat Analisis Blood Agar.....	88
Lampiran 5. Sertifikat Analisis Media BHIB .....	89
Lampiran 6. Sertifikat Pengujian <i>P.acne</i> .....	90
Lampiran 7. Perhitungan Sampel Ekstrak, Fraksi, Isolat .....	91
Lampiran 8. Perhitungan Suspensi Bakteri, Klindamisin.....	97
Lampiran 9. Uji Aktivitas KBM Ekstrak Daun Mimba (Eksperimen 1).....	98
Lampiran 10. Uji Aktivitas KBM Ekstrak Daun Mimba (Eksperimen 2).....	99
Lampiran 11. Uji Aktivitas KBM Fraksi Ekstrak N-Heksan Daun Mimba (Eksperimen 1).....	100
Lampiran 12. Uji Aktivitas KBM Fraksi Ekstrak N-Heksan Daun Mimba (Eksperimen 2).....	101
Lampiran 13. Uji Aktivitas KBM Fraksi Ekstrak Etil Asetat Daun Mimba (Eksperimen 1).....	102
Lampiran 14. Uji Aktivitas KBM Fraksi Ekstrak Etil Asetat Daun Mimba (Eksperimen 2).....	103
Lampiran 15. Uji Aktivitas KBM Isolat pada <i>P.acne</i> (Eksperimen 1).....	104
Lampiran 16. Uji Aktivitas KBM Isolat pada <i>P.acne</i> (Eksperimen 2).....	105
Lampiran 17. Uji Aktivitas KBM Isolat pada <i>S.aureus</i> (Eksperimen 1).....	106
Lampiran 18. Uji Aktivitas KBM Isolat pada <i>S.aureus</i> (Eksperimen 2).....	107
Lampiran 19. Uji Aktivitas KBM Isolat pada <i>S.epidermidis</i> (Eksperimen 1).....	108
Lampiran 20. Uji Aktivitas KBM Isolat pada <i>S.epidermidis</i> (Eksperimen 2).....	109
Lampiran 21. Spektrum IR Senyawa Isolat 1.....	110
Lampiran 22. Spektrum GC-MS Senyawa Isolat 1.....	111
Lampiran 23. Spektrum H NMR Senyawa Isolat 1.....	112
Lampiran 24. Spektrum C NMR dan DEPT 135 Senyawa Isolat 1 .....	113
Lampiran 25. HMBC Senyawa Isolat 1.....	114
Lampiran 26. HMQC Senyawa Isolat 1 .....	115
Lampiran 27. Spektrum IR Senyawa Isolat 3.....	116

Lampiran 28. Spektrum GC-MS Senyawa Isolat 3.....	117
Lampiran 29. Spektrum H NMR Senyawa Isolat 3.....	118
Lampiran 30. Spektrum C NMR dan DEPT Senyawa Isolat 3.....	119

## DAFTAR SINGKATAN

BHIB	<i>Brain Heart Infusion Borth</i>
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DMSO	<i>Dimethyl Sulfoxide</i>
EEA	Ekstrak Etil Asetat
EME	Ekstrak Metanol
ENH	Ekstrak N-Heksan
GC-MS	<i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantun Correlation</i>
IR	<i>Infra Red</i>
KBM	Konsentrasi Bunuh Minimum
KHM	Konsentrasi Hambat Minimum
KLT	Kromatografi Lapis Tipis
NA	<i>Nutrient Agar</i>
NB	<i>Nutrient Borth</i>
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
Rf	<i>Retention Factor</i>
UV	Ultra Violet



# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Wajah merupakan salah satu bagian terpenting dalam struktur anatomi tubuh manusia. Wajah mudah mengalami gangguan kesehatan, baik yang disebabkan oleh produksi kelenjar minyak berlebihan, faktor hormonal, maupun akibat kurangnya kebersihan wajah. Gangguan yang sering muncul pada kulit wajah salah satunya adalah jerawat (Nugroho, 2013). Jerawat merupakan penyakit radang kronis yang mempengaruhi kelenjar sebacea. Respon inflamasi pada kelenjar sebacea terhadap multimikroba yang berlebih seperti *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* dan lain-lain merupakan salah satu faktor penyebab timbulnya jerawat (Kumar, et al., 2016).

Salah satu terapi untuk menanggulangi pertumbuhan mikroorganisme yang berlebihan adalah dengan pemberian antibiotik. Klindamisin adalah salah satu antibiotik yang direkomendasikan untuk terapi jerawat (Nast, et al., 2012; Zaenglein, et al., 2016) dan memiliki efek bakterisidal pada bakteri penyebab jerawat. Namun penggunaan klindamisin jangka panjang memunculkan strain *P. acnes* yang resistan terhadap klindamisin (Nugroho, 2013). Sehingga diperlukan terapi alternatif salah satunya berasal dari bahan alami.

Masyarakat Indonesia telah banyak memanfaatkan tanaman tradisional untuk menanggulangi berbagai macam penyakit. Salah satu tanaman yang telah digunakan sebagai obat tradisional adalah mimba (*Azadirachta indica* A. Juss.) (Farendina, 2022). Mimba atau yang dikenal neem adalah tumbuhan hijau asli India yang termasuk kedalam genus *Azadirachta* (Islas, et al., 2020). Tumbuhan ini tersebar pada beberapa daerah di Jawa Tengah, Jawa Timur, Jawa Barat, Bali dan Nusa Tenggara (Herawati, 2004).

Berdasarkan beberapa penelitian daun mimba telah diketahui memiliki aktivitas antibakteri, antijamur, antihipertensi, antijamur, antihiperlikemik, antioksidan dan aktivitas biologis lainnya (Setiawansyah et al., 2018; Wahjuni et al., 2016). Senyawa kimia yang didapat dari penelitian Akpuaka et al (2013) diketahui dari ekstrak n-heksan

diantaranya adalah Benzyl alcohol, Benzoic acid, Dodecane, Hexadecane, p-Xylene, Gamma-sitosterol, Docosane, Octadecanoic acid, dan lain-lain, sedangkan pada ekstrak etil asetat meliputi Stigmasterol, 3-Hydroxy-4-methoxy benzoic acid, n-Hexadecanoic acid, phytol, Gamma-elemene, Hexahydrofarnesyl acetone, dan lain-lain. Pada ekstrak methanol terkandung senyawa m-Tolulaldehyde, 14-methylpentadecanoate, Lineoleoyl chloride dan Methyl isoheptadecanoate (Hamid Nour *et al.*, 2014).

Penelitian Mas Rufah (2020) ekstrak etanol 90% daun mimba mempunyai aktivitas antibakteri *P. acnes* dengan zona hambat 7 yang masuk dalam kategori sedang dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Namun ekstrak selain etanol, fraksi, dan isolat belum pernah di teliti aktivitasnya terhadap bakteri jerawat. Berdasarkan latar belakang tersebut, maka penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas antibakteri penyebab jerawat secara *in vitro* dari daun mimba yang diekstraksi secara bertingkat menggunakan pelarut polar (metanol), semi polar (etil asetat) dan non polar (n-heksan). Ekstrak yang memiliki aktivitas paling baik selanjutnya akan dilakukan proses fraksinasi, dan diuji kembali aktivitasnya. Kemudian senyawa yang terkandung pada fraksi teraktif akan diisolasi dan diuji kembali aktivitasnya. Isolat teraktif diidentifikasi dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis, Spektrofotometer Infra Red, Spektrofotometer Massa dan Spektrofotometer Nuclear Magnetic Resonance.

## **1.2 Rumusan Masalah**

Daun mimba yang merupakan tanaman tradisional telah diketahui memiliki aktivitas antibakteri. Dari penelitian sebelumnya, ekstrak etanol daun mimba memberikan efek penghambatan terhadap bakteri *P.acne* namun pengujian aktivitas antibakteri senyawa aktif dari ekstraksi bertingkat dan karakterisasi senyawa aktif belum pernah dilaporkan.

## **1.3 Tujuan Penelitian**

### **1.3.1 Tujuan Umum**

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk identifikasi ekstrak, fraksi dan isolat paling aktif dari daun mimba serta mengidentifikasi senyawa aktif tersebut.

### **1.3.2 Tujuan Khusus**

- a. Mengevaluasi aktivitas ekstrak dari ekstraksi bertingkat daun mimba (n-heksan, etil asetat, metanol) terhadap bakteri *P. acne*.

- b. Mengevaluasi fraksi dari ekstrak terpilih daun mimba terhadap bakteri *P. acne*.
- c. Mengevaluasi isolat dari fraksi terpilih daun mimba terhadap bakteri *P.acne*, *S.aureus* dan *S.epidermidis*.
- d. Mengidentifikasi senyawa dari isolat teraktif.

#### **1.4 Manfaat Hasil Penelitian**

Diharapkan hasil penelitian ini diharapkan dapat memperoleh informasi terkait karakter senyawa aktif dari daun mimba yang memiliki aktivitas terhadap bakteri penyebab jerawat yaitu bakteri *P.acne*, *S.aureus* dan *S.epidermidis*.

#### **1.5 Hipotesis**

Adapun hipotesis dari penelitian ini adalah sebagai berikut;

- a. Ekstrak dari daun mimba memiliki aktivitas terhadap bakteri *P.acne*.
- b. Fraksi dari ekstrak teraktif daun mimba memiliki aktivitas terhadap bakteri *P.acne*.
- c. Isolat dari fraksi teraktif daun mimba memiliki aktivitas terhadap bakteri *P.acne*.
- d. Diperoleh karakterisasi senyawa dari isolat teraktif daun mimba yang memiliki aktivitas terhadap bakteri *P.acne*.

## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 *Azadirachta indica* A. Juss

Mimba merupakan tanaman asli dari India. Mimba juga tersebar di wilayah Asia Selatan dan Asia Tenggara, termasuk Sri Lanka, Malaysia, Pakistan, Thailand dan Indonesia. Wilayah penyebaran mimba lainnya adalah di Mauritius, Karibia, Fiji serta di beberapa negara di Amerika. Di Indonesia, tanaman ini banyak tumbuh di daerah, Bali, Subang dan di daerah pantai utara Jawa Timur. Di Bali jumlah tanaman mimba diperkirakan lebih 500 ribu pohon dan dikenal dengan nama intaran. Selain itu, tanaman ini juga banyak ditemukan di Lombok, jumlahnya diperkirakan sekitar 250-300 ribu pohon. Pohon mimba hampir sama dengan pohon mindi (*Melia azedarach*), terutama ketika masih berupa bibit. Tidak heran jika masyarakat sering mengalami kesulitan untuk membedakan antara tanaman mimba dengan tanaman mindi. Berdasarkan ilmu taksonomi tumbuhan, mimba berbeda dengan mindi dari tingkat marga (Sukrasno, 2003).

##### 2.1.1 Klasifikasi

Adapun klasifikasi mimba menurut Cronquist (1981) adalah sebagai berikut:

Kerajaan	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Subdivisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Bangsa	: Rutales
Suku	: Meliaceae
Marga	: <i>Azadirachta</i>
Jenis	: <i>Azadirachta indica</i> A. Juss

##### 2.1.2 Nama Tanaman

Mimba atau biasa dikenal dengan nama lain *Azadirachta indica* A. Juss memiliki berbagai sebutan, antara lain nim, neem (Arab); nimgach, nim (Bengali); bowtamaka, thinboro, tamarkha, tamar, tamaka, tamabin (Burma); persian lilac, neem tree, bastard tree, Indian lilac, bead tree, Indian cedar (Inggris); margousier, margosier,

neem, nim, azadirac de l'Inde (Prancis); Indischer zadrach (Jerman); margosa, nimbo (Portugis); neem, balnimb, nim, veppam, nind, ve mpu (India); sadu, baypay, mambu, veppam (Malaysia); dan sadao, kadao, sadao India, khwinin, saliam atau cha-tang (Thailand). Di Indonesia, tanaman mimba memiliki berbagai sebutan, seperti mindi, intaran, membha, imba, mempheuh (Madura), dan mimba (Jawa) (Heyne, 1987) dan (Utami dan Puspaningtyas, 2013:145).

### 2.1.3 Morfologi

Pohon mimba mempunyai tinggi yang berkisar antara 10-15 meter. Batang berkayu, tegak, bulat, permukaan kasar, percabangan simpodial, berwarna coklat. Daun mimba berbentuk daun majemuk yang tersusun saling berhadapan di petiol atau tangkai daun. Bentuknya lonjong dengan tepi bergerigi. Helaian anak daun berwarna coklat kehijauan, panjang helaian daun 5 cm, lebar 3 cm sampai 4 cm (Adi, 2008). Ujung daun meruncing, pangkal daun miring, tepi daun bergerigi kasar. Tulang daun menyirip, tulang cabang utama umumnya hampir sejajar satu dengan yang lainnya (Sukrasno, 2003). Morfologi tanaman mimba dapat dilihat pada Gambar 2.1.



**Gambar 2.1** Tanaman Mimba (Sumber : Dokumen Pribadi)

Buah mimba memiliki bentuk bulat lonjong seperti melinjo dengan ukuran maksimal 2 cm, buah yang matang dengan warna kuning atau hijau kekuningan. Buah mimba baru dapat dipanen setelah pohon berumur 3-5 tahun lamanya. Setelah berumur 10 tahun dan mencapai umur produktif penuh tanaman ini dapat menghasilkan buah. Pada umur produktif tanaman mimba juga dapat menghasilkan buah sebanyak 50kg

setiap pohonnya (Rukmana, 2002).

Tangkai daun berwarna hijau, panjang 8-20 cm seperti dapat dilihat pada gambar 2.2 Bunga tumbuh majemuk di ujung cabang dan berkelamin dua. Bentuk tangkai silindris, panjang 8-15 cm. Benang sari berbentuk silindris, berwarna putih kekuningan. Bentuk putik lonjong warna cokelat muda. Mahkota bunga halus, warna putih. Kelopak bunga berwarna hijau. Buah buni, berbentuk bulat telur, warna hijau. Biji bulat, diameter sekitar 1 cm, berwarna putih. Akar tunggang, berwarna cokelat (Adi, 2008:8).



**Gambar 2.2** Daun Mimba (Dokumen Pribadi)

#### **2.1.4 Manfaat dan Efek Farmakologi**

Tanaman mimba secara tradisional dimanfaatkan sebagai obat demam, menguatkan badan, menurunkan panas dan lain-lain, membersihkan darah, mengaktifkan kelenjar tubuh secara tidak langsung memperbaiki sirkulasi darah, serta menjaga kesehatan organ jantung (Adi, 2008:129). Penggunaan secara tradisional pada daun mimba dengan cara mengambil 7 lembar daun mimba direbus dengan 3 gelas air hingga menyisakan 1.5 gelas. Setelah dingin disaring, dan diminum tiga kali sehari setiap pagi, siang, dan sore, lalu pada kulit yang berjerawat dengan cara dioleskan pada wajah seperti memakai toner (Faizah, *et.al*, 2016). Selain itu, daun mimba mempunyai efek farmakologi sebagai anti-inflamasi, antirematik, antipiretik, penurun gula darah, antitukak lambung, hepatoprotektor (pelindung hati), antifertilitas, antivirus, antikanker, antibakteri, antidiare, antijamur, antitumor, antidiare, diuretik, analgesik, hiperkolesterol (Sukrasno, 2003:11).

#### **2.1.5 Kandungan Kimia**

Kandungan senyawa aktif dalam mimba antara lain disetil vilasinin, nimbandiol, 3-desasetil salanin, salanol, azadirachtin, azadiron, azadiradion,

epoksiazadiradion, gedunin, 17-epiazadiradion, 17-hidroksi azadiradion, azaridin, quercetin, kaemferol, sedikit mirisetin, nimbin, nimbinin, nimbidin, nimbosterol, nimbosterin, sugiol, nimbiol, dan margosin. (Utami dan Puspaningtyas, 2013).

Senyawa kimia yang didapat dari penelitian Akpuaka *et al* (2013) diketahui dari ekstrak n-heksan diantaranya adalah Benzyl alcohol, Benzoic acid, Dodecane, Hexadecane, p-Xylene, Gamma-sitosterol, Docosane, Octadecanoic acid, dan lain-lain, sedangkan pada ekstrak etil asetat meliputi Stigmasterol, 3-Hydroxy-4-methoxy benzoic acid, n-Hexadecanoic acid, phytol, Gamma-elemene, Hexahydrofarnesyl acetone, dan lain-lain. Pada ekstrak methanol terkandung senyawa m-Tolulaldehyde, 14-methylpentadecanoate, Lineoleoyl chloride dan Methyl isoheptadecanoate (Hamid Nour *et al.*, 2014).

## 2.2 Simplisia

Simplisia merupakan bahan alam yang digunakan sebagai obat yang belum mengalami pengolahan apapun juga, kecuali dinyatakan lain, berupa bahan yang telah dikeringkan. Simplisia nabati merupakan simplisia berupa tanaman utuh, bagian tanaman dan eksudat tanaman. Eksudat tanaman merupakan isi yang spontan keluar dari tanaman atau isi sel yang dikeluarkan dari selnya dengan cara tertentu atau zat yang dipisahkan dari tanamannya dengan cara tertentu yang masih belum berupa zat kimia murni. Simplisia hewani adalah simplisia berupa hewan utuh, bagian hewan atau zat yang dihasilkan hewan yang masih belum berupa zat kimia murni. Simplisia mineral merupakan simplisia berasal dari bumi, tidak berupa zat kimia murni (Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, 2000).

## 2.3 Ekstrak

Ekstrak merupakan sediaan pekat yang didapat dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang ditetapkan. Ekstrak dapat berupa sediaan kering, kental atau cair (Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan,

2000).

Proses pembuatan ekstrak dapat dilakukan dengan tahapan sebagai berikut (Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, 2000) :

a. Pembuatan serbuk simplisia

Proses awal pembuatan ekstrak tahapan pembuatan serbuk simplisia kering sampai derajat kehalusan tertentu.

b. Pemilihan cairan pelarut

Cairan pelarut dalam proses pembuatan ekstrak yaitu pelarut yang baik (optimal) untuk senyawa kandungan yang berkhasiat atau yang aktif, dengan demikian senyawa tersebut dapat dipisahkan dari senyawa kandungan lainnya, serta ekstrak hanya mengandung sebagian besar senyawa kandungan yang diinginkan. Cairan pelarut dipilih yang melarutkan hampir semua metabolit sekunder yang terkandung. Saat ini berlaku aturan bahwa pelarut yang diperbolehkan adalah air dan etanol serta campurannya. Jenis pelarut lainnya seperti metanol, heksana, toluen, kloroform, dan aseton umumnya digunakan sebagai pelarut untuk tahap pemisahan dan tahap pemurnian (fraksinasi).

c. Pemisahan dan pemurnian

Tahap ini bertujuan untuk memisahkan senyawa yang tidak dikehendaki semaksimal mungkin tanpa berpengaruh pada senyawa kandungan yang dikehendaki sehingga diperoleh ekstrak yang lebih murni. Proses pada tahapan ini adalah pengendapan, pemisahan dua cairan tak bercampur, sentrifugasi, dekantasi, filtrasi serta proses adsorpsi dan penukar ion.

d. Pemekatan/penguapan (evaporasi)

Pemekatan berarti peningkatan jumlah partikel solute (senyawa terlarut) secara penguapan pelarut sampai ekstrak menjadi kental/pekat. Pemekatan dapat dilakukan menggunakan vakum evaporator yang dapat mempercepat proses penguapan pelarut dalam ekstrak.

e. Rendemen

Redemen adalah perbandingan antara ekstrak yang diperoleh dengan simplisia awal. Perhitungan rendemen sebagai berikut :

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot Ekstrak}}{\text{Bobot simplisia}} \times 100\% \quad (\text{Persamaan 2.1})$$

Tahapan dalam proses ekstraksi bahan alam berawal dari pelarut yang membasahi permukaan matriks dan dapat menembus masuk ke dalam sel untuk melarutkan senyawa, selanjutnya dengan prinsip difusi pelarut dengan konsentrasi zat terlarut yang tinggi akan keluar dari matriks digantikan dengan pelarut lainnya hingga pelarut mencapai titik jenuh oleh zat terlarut (Zhang, Lin, & Ye, 2018). Terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi efektivitas ekstraksi, diantaranya adalah:

a. Jenis dan Karakteristik Pelarut

Jenis pelarut mempengaruhi jenis dan jumlah zat terlarut, serta kecepatan ekstraksi. Pelarut akan melarutkan senyawa yang memiliki sifat sejenis (Azmir, *et al.*, 2013).

b. Temperatur

Temperatur ekstraksi dapat mempengaruhi kecepatan ekstraksi. Peningkatan temperatur mampu meningkatkan energi di dalam sistem sehingga meningkatkan laju ekstraksi.

c. Rasio Jumlah Pelarut dan Bahan

Semakin besar rasio antara pelarut dan bahan akan meningkatkan laju reaksi ekstraksi, dan zat yang dapat terekstraksi semakin banyak.

d. Ukuran Partikel Bahan

Suatu bahan dengan ukuran partikel kecil akan memiliki luas permukaan yang lebih besar sehingga semakin banyak berinteraksi dengan pelarut.

e. Pengadukan

Proses pengadukan berfungsi untuk mempercepat dan meningkatkan kontak antara bahan dan pelarut (Mandal, & Das, 2015).

## **2.4 Metode Ekstraksi**

### **2.4.1 Ekstraksi**

Ekstraksi merupakan proses penarikan kandungan kimia dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Senyawa aktif yang terdapat dalam berbagai simplisia dapat digolongkan kedalam golongan minyak atsiri, alkaloid, flavonoid dan lain-lain. Dengan diketahuinya senyawa aktif yang dikandung simplisia akan mempermudah pemilihan pelarut dan cara ekstraksi yang tepat (Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, 2000).

### **2.4.2 Metode Ekstraksi Konvensional**

#### 2.4.2.1 Ekstraksi dengan pelarut

##### a. Cara dingin

###### 1) Maserasi

Maserasi merupakan proses pengestrakan simplisia yang menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan. Secara teknologi termasuk ekstraksi dengan prinsip pencapaian konsentrasi pada keseimbangan. Maserasi kinetik berarti dilakukan pengadukkan yang terus menerus. Remaserasi dilakukan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyarian maserat pertama dan seterusnya (Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, 2000).

###### 2) Perkolasi

Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai penyarian sempurna yang umumnya dilakukan pada temperatur ruangan. Proses terdiri dari tahap pengembangan bahan, tahap maserasi antara dan tahap perkolasi sebenarnya (penetasan/penampungan ekstrak) secara terus menerus sampai diperoleh ekstrak (perkolat) yang jumlahnya 1-5 kali bahan (Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, 2000).

## b. Cara Panas

### 1) Refluks

Refluks merupakan 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 (Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, 2000).

### 2) Sokletasi

Sokletasi merupakan ekstraksi menggunakan pelarut yang baru yang umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi yang berkelanjutan dengan jumlah pelarut yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik (Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, 2000).

### 3) Digesti

Digesti adalah maserasi kinetik (dengan pengadukan kontinu) pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur ruangan (kamar) yaitu secara umum dilakukan pada temperatur 40-50°C (Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, 2000).

### 4) Infus

Infus merupakan ekstraksi dengan pelarut air pada temperatur penangas air (bejana infus tercelup dalam penangas air mendidih, temperatur terukur 96 - 98°C) Selama waktu tertentu (15-20 menit) (Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, 2000).

### 5) Dekok

Dekok adalah infus pada waktu yang lebih lama (>30 menit) dengan temperatur sampai titik didih air (Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, 2000).

### 6) Destilasi Uap

Destilasi uap merupakan ekstraksi kandungan senyawa mudah menguap dari bahan segar atau simplisia dengan uap air. Cara ini didasarkan pada peristiwa tekanan parsial senyawa kandungan menguap dengan fase uap air dari ketel secara berlanjut sampai sempurna dan diakhiri dengan kondensasi fase uap campuran menjadi destilasi air bersama senyawa kandungan yang memisah sempurna atau memisah

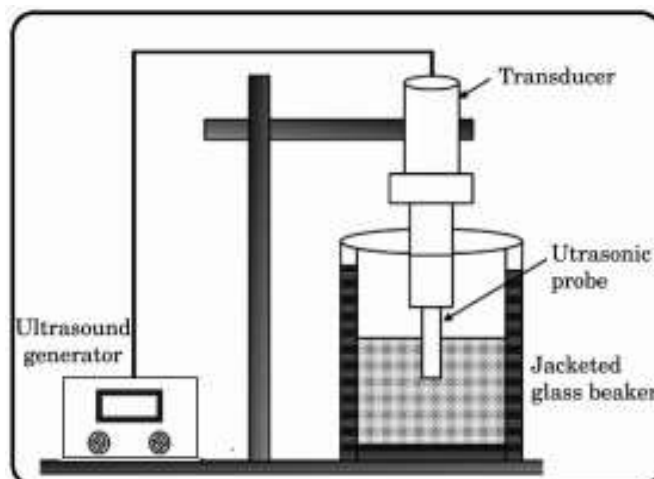
sebagian (Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, 2000).

### **2.4.3 Metode Ekstraksi Modern**

Berbagai keterbatasan yang dimiliki metode ekstraksi konvensional seperti waktu ekstraksi yang lebih lama, kebutuhan pelarut yang banyak dan mahal, selektivitas ekstraksi rendah, dan risiko terjadinya kerusakan pada senyawa termolabil akibat penggunaan pemanasan, berbagai penelitian dilakukan untuk mengembangkan teknik ekstraksi baru yang lebih efektif dan efisien. Beberapa Teknik ekstraksi modern yang telah dikembangkan adalah sebagai berikut;

#### *a. Ultrasound Assisted Extraction (UAE)*

*Ultrasound Assisted Extraction (UAE)* merupakan salah satu teknik ekstraksi senyawa dari bahan alam yang paling modern saat ini. Gelombang Ultrasonik adalah gelombang suara berfrekuensi tinggi di atas kapasitas pendengaran manusia (>20 kHz), yang dapat melewati media padat, gas, dan cair. Ultrasonografi diklasifikasikan menurut rentang frekuensinya yaitu power ultrasonik (20-100 kHz) dan ultrasonik diagnostik (1-10 MHz). Gelombang- gelombang ini diketahui dapat menghasilkan kavitasi dalam medium cair sebagai tambahan dari efek mekanis lainnya seperti dispersi, difusi, dan agitasi cairan yang intens. Terpecahnya gelembung kavitasi menyebabkan tekanan mekanis pada sel mengalami disrupsi yang dapat menyebabkan penetrasi pelarut ke dalam sel meningkat, hal tersebut membantu meningkatkan kelarutan senyawa di dalam sel yang kemudian memudahkan proses ekstraksi. Gelombang ultrasonik dapat meningkatkan interaksi antara bahan dan pelarut serta menurunkan energi termal sehingga dapat meningkatkan efektivitas ekstraksi. Proses yang sederhana, kemudahan dalam pengoperasian, biaya yang rendah, kebutuhan jumlah pelarut yang lebih sedikit, dan waktu ekstraksi yang lebih cepat, metode ekstraksi UAE ini semakin populer dan dapat menjadi metode yang sangat menjanjikan, andal, serta layak untuk dikembangkan sebagai metode ekstraksi senyawa dari bahan alam pada skala industri di masa depan (Shahid & Yusuf, 2015). Skema ekstraksi UAE ditunjukkan pada Gambar 2.3.



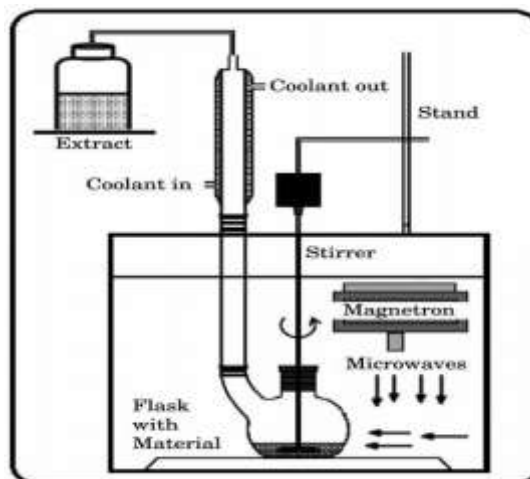
**Gambar 2.3** Sistem Ekstraksi *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE)

[sumber :Shahid & Yusuf, 2015]

b. *Microwave Assisted Extraction* (MAE)

Gelombang mikro adalah radiasi elektromagnetik non-ion dengan frekuensi mulai dari 300 MHz hingga 300 GHz. Pengembangan metode ekstraksi dengan microwave pertama kali dilaporkan pada tahun 1986. MAE mentransfer energi ke larutan yang dipanaskan oleh mekanisme konduksi ionic ganda dan rotasi dipol. Frekuensi radiasi sesuai dengan gerakan rotasi molekul dalam materi yang terkondensasi menyebabkan terjadinya penyerapan energi sehingga terjadi redistribusi energi antara molekul dan tercapainya pemanasan homogen dari medium. MAE menyebabkan gangguan ikatan hidrogen dan migrasi ion terlarut, menghasilkan peningkatan penetrasi pelarut ke dalam matriks, yang memfasilitasi ekstraksi senyawa target. Tekanan signifikan yang dikembangkan di dalam matriks menyebabkan ada peningkatan porositas dari matriks biologis yang menghasilkan penetrasi pelarut yang lebih tinggi ke dalam matriks. Ada dua jenis utama sistem MAE, yaitu kanal tertutup dan kanal terbuka. Kanal tertutup yang digunakan untuk ekstraksi senyawa target pada kondisi suhu dan tekanan yang lebih tinggi, sedangkan sistem kanal terbuka digunakan untuk ekstraksi pada kondisi tekanan atmosfer. Banyak laporan telah dipublikasikan tentang aplikasi gelombang mikro untuk mengekstraksi senyawa dari tanaman dalam beberapa tahun terakhir. Mekanisme ekstraksi MAE pada dasarnya melibatkan tiga langkah berurutan: (i) pemisahan zat terlarut dari situs aktif matriks sampel di bawah peningkatan suhu dan tekanan; (ii) difusi pelarut di seluruh matriks sampel; (iii) pelepasan zat terlarut dari matriks sampel ke

dalam pelarut (Shahid & Yusuf, 2015). Terdapat dua metode MAE yaitu *solvent free extraction* atau ekstraksi bebas pelarut (umumnya digunakan untuk senyawa volatil) dan *solvent extraction* atau ekstraksi pelarut (umumnya digunakan untuk senyawa non-volatil) (Zhang *et al.*, 2018). Skema ekstraksi metode MAE ditunjukkan pada Gambar 2.4.



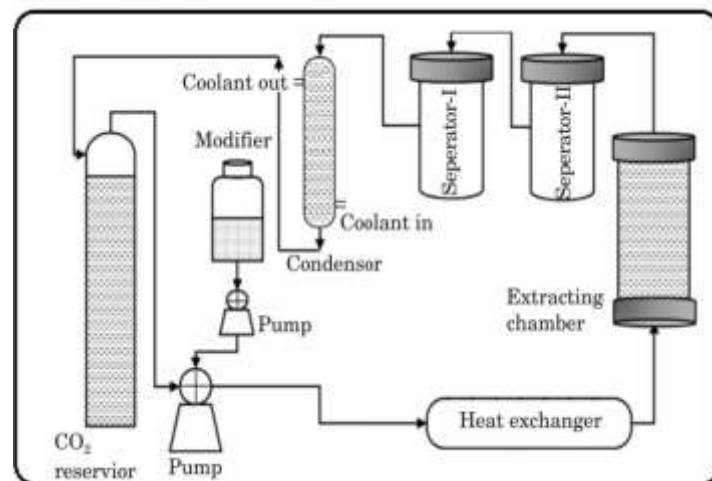
**Gambar 2.4** Sistem ekstraksi *Microwave Assisted Extraction* (MAE)

[sumber : Shahid & Yusuf, 2015]

### c. *Supercritical Fluid Extraction* (SFE)

Supercritical fluid atau cairan superkritis adalah cairan yang memiliki suhu dan tekanan di atas titik kritis, terletak antara fase cair dan gas. Cairan superkritis memiliki kerapatan cairan yang khas, viskositasnya hampir sama dengan gas, dan difusivitas seimbang antara cairan dan gas. Cairan superkritis memiliki viskositas rendah dan difusivitas tinggi sehingga memiliki sifat transportasi yang jauh lebih baik daripada cairan. Kelebihan SFE adalah kepadatan cairan dapat diubah dengan melakukan perubahan suhu dan tekanan fluida, dengan demikian daya larut dari cairan juga dapat diubah oleh perubahan suhu dan tekanan, hal tersebut tergantung pada kepadatan cairan. Metode SFE menawarkan tingkat ekstraksi yang cepat dengan hasil yang tinggi dan merupakan prosedur ramah lingkungan dengan minimal atau tanpa menggunakan pelarut organik. SFE telah banyak digunakan di bidang makanan, farmasi, pestisida, dan industri bahan bakar. Karbon dioksida adalah cairan yang paling umum digunakan untuk aplikasi SFE karena konstanta kritisnya yang rendah, tidak beracun, tidak mudah terbakar, dan ketersediaannya dalam kemurnian tinggi dengan rendah biaya. Satu-satunya kelemahan

CO<sub>2</sub> superkritis (SC-CO<sub>2</sub>) adalah polaritasnya yang rendah. Sifat pelarut CO<sub>2</sub> superkritis yang baik membuatnya ideal untuk ekstraksi senyawa non-polar seperti hidrokarbon, sedangkan quadrupole yang besar juga memungkinkannya untuk melarutkan beberapa senyawa agak polar seperti alkohol, ester, aldehida, dan keton. Keterbatasan polaritas rendah karbon dioksida telah berhasil diatasi dengan penggunaan bahan pengubah kimia (Shahid & Yusuf, 2015). Proses SFE dimulai dengan gas CO<sub>2</sub> yang dikondensasikan terlebih dahulu hingga menjadi cairan, dipompa ke area pemanas, dipanaskan hingga kondisi superkritis, kemudian dimasukkan ke dalam bejana ekstraksi dengan tekanan yang lebih rendah. Cairan superkritis tersebut dapat berdifusi dengan cepat ke dalam matriks dan melarutkan material yang akan diekstraksi. Bahan yang terlarut dialirkan keluar dari bejana ekstraksi pada tekanan rendah, dan bahan yang diekstraksi mengendap. CO<sub>2</sub> kemudian dapat didinginkan, dikompres dan didaur ulang, atau dibuang ke atmosfer (Sapkale, 2010). Skema metode Supercritical Fluid Extraction (SFE) ditunjukkan pada Gambar 2.5.



**Gambar 2.5** Skema metode *Supercritical Fluid Extraction* (SFE)

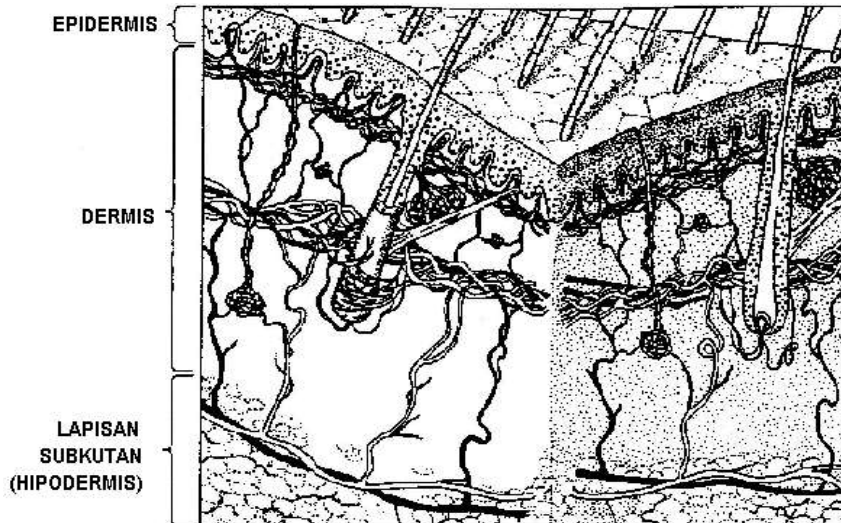
[sumber : Shahid & Yusuf, 2015]

## 2.5 Anatomi dan Fisiologi Kulit

Kulit merupakan suatu *Shell* yang fleksibel, mudah melentur, protektif, mengatur diri sendiri yang melindungi sistem hidup kita. *Shell* mengandung sistem sirkulasi dan sistem evaporasi untuk menstabilkan temperatur dan tekanan badan. Kulit terususun oleh banyak macam jaringan, termasuk pembuluh darah, kelenjar lemak, kelenjar

keringat, organ pembuluh perasa dan urat syaraf, jaringan pengikat, otot polos dan lemak. Diperkirakan luas permukaan kulit  $\pm$  18 kaki kuadrat. Berat kulit tanpa lemak adalah  $\pm$  8 pond (Anief, 2002).

### 2.5.1 Struktur Kulit



Gambar 2.6 Struktur kulit (Kalangi, 2014)

Kulit terdiri atas 3 lapisan utama yaitu epidermis, dermis dan hipodermis. Epidermis merupakan jaringan epitel yang berasal dari ektoderm, sedangkan dermis berupa jaringan ikat agak padat yang berasal dari mesoderm. Di bawah dermis terdapat selapis jaringan ikat longgar yaitu hipodermis, yang pada beberapa tempat terutama terdiri dari jaringan lemak (Kalangi, 2014).

#### a. Lapisan Epidermis

Epidermis merupakan lapisan paling luar kulit dan terdiri atas epitel berlapis gepeng dengan lapisan tanduk. Epidermis hanya terdiri dari jaringan epitel, tidak mempunyai pembuluh darah maupun limfe; oleh karena itu semua nutrisi dan oksigen diperoleh dari kapiler pada lapisan dermis. Epitel berlapis gepeng pada epidermis ini tersusun oleh banyak lapis sel yang disebut keratinosit. Sel ini secara tetap diperbarui melalui mitosis sel-sel dalam lapis basal yang secara berangsur digeser ke permukaan epitel. Selama perjalanannya, sel-sel ini berdiferensiasi, membesar, dan mengumpulkan filamen keratin dalam sitoplasmanya. Mendekati permukaan, sel-sel ini mati dan secara tetap dilepaskan (terkelupas).

## **b. Lapisan Dermis**

Dermis atau korium tebalnya 3-5 mm, merupakan anyaman serabut kolagen dan elastin, yang bertanggung jawab untuk sifat-sifat penting dari kulit. Dermis mengandung pembuluh darah, pembuluh limfe, gelembung rambut, kelenjar lemak (sebase), kelenjar keringat, otot dan serabut syaraf dan korpus pacini. Daerah atas dari dermis terdapat *papillae* membentuk lapisan papil yang berhubungan ke dalam epidermis. Lapisan mengandung akhir syaraf yang dipengaruhi oleh perubahan suhu dan aplikasi anestetika local dan iritasi. (Anief, 2002; Kalangi, 2014).

## **c. Lapisan Hipodermis**

Sebuah lapisan subkutan di bawah retikularis dermis disebut hipodermis. Ia berupa jaringan ikat lebih longgar dengan serat kolagen halus terorientasi terutama sejajar terhadap permukaan kulit, dengan beberapa di antaranya menyatu dengan yang dari dermis. Pada daerah tertentu, seperti punggung tangan, lapis ini memungkinkan gerakan kulit di atas struktur di bawahnya. Di daerah lain, serat-serat yang masuk ke dermis lebih banyak dan kulit relatif sukar digerakkan. Sel-sel lemak lebih banyak daripada dalam dermis. Jumlahnya tergantung jenis kelamin dan keadaan gizinya. Lemak subkutan cenderung mengumpul di daerah tertentu. Tidak ada atau sedikit lemak ditemukan dalam jaringan subkutan kelopak mata atau penis, namun di abdomen, paha, dan bokong, dapat mencapai ketebalan 3 cm atau lebih. Lapisan lemak ini disebut *pannikulus adiposus* (Anief, 2002; Kalangi, 2014).

### **2.5.2 Fungsi Kulit**

Kulit sebagai alat peraba memiliki banyak fungsi antara lain:

- a. Fungsi kulit mekanik: mencegah gerakannya dan membatasi jaringan dibawahnya, tergantung pada dermis dan epidermis. Kulit bersifat elastic dapat meregang dan bersifat reversible, serabut kolagen tetap dan tidak berperan dalam menjaga tekanan (Anief, 2002; Kalangi, 2014).
- b. Fungsi kulit pelindung: (Anief, 2002; Kalangi, 2014)
  - 1) Sawar mikrobiologi

Stratum korneum merupakan pertahanan terhadap mikroorganisme dan fungsi pelindung. Sekresi sebase dan ekrin meninggalkan asam mantel pada permukaan kulit dengan pH 4,2 – 5,6 dan merupakan sawar terhadap bakteri. Kelenjar kulit mensekresi

juga asam lemak, seperti: asam propionat, butirrat, kaproat, yang bersifat bakteriostatik dan fungisid.

2) Bekerja dalam dua arah yaitu:

Kehilangan air badan, elektrolit, zat badan dan sawar terhadap masuknya zat molekul kimi yang merugikan badan. Stratum korneum membantu dalam tahap pembatasan kecepatan absropsi perkutan, walaupun dapat merintanggi penetrasi obat yang hidrofobik.

3) Sawar radiasi

Sinar UV pajang gelombang 290 – 400 nm sangat potensial merusak jaringan biologis. Kulit mencegah atau mengurangi kerusakan lebih besar terutama dengan pigmentasi.

4) Sawar panas dan pengatur suhu

Kulit merupakan organ yang menjaga panas badan tetap pada sistem isotherm pada 37°C, bila suhu badan turun kulit akan memucat, karena sirkulasi darah ke perifer tertutup untuk mengurangi kehilangan panas badan.

## 2.6 *Acne vulgaris*

*Acne vulgaris* adalah suatu penyakit peradangan kronik dari unit pilosebaceus disertai penyumbatan dari penimbunan bahan keratin duktus kelenjar yang diatandai dengan adanya komedo, papula, pustula, nodul, kista sering ditemukan pula skar pada daerah predileksi seperti muka, bahu bagian atas dari ekstremitas superior, dada dan punggung (Afriyanti, 2015).

Lesi utama *acne vulgaris* adalah mikrokomedo, atau mikrokomedone, yaitu pelebaran folikel rambut yang mengandung sebum dan *Propionibacterium acnes*. Sedangkan lesi *acne* lainnya dapat berupa papul, pustul, nodul, dan kista pada daerah predileksi *acne* yaitu pada wajah, bahu, dada, punggung, dan lengan atas. Komedo yang tetap berada di bawah permukaan kulit tampak sebagai komedo *white head*, sedangkan komedo yang bagian ujungnya terbuka pada permukaan kulit disebut komedo *black head* karena secara klinis tampak berwarna hitam pada epidermis. *Scar* dapat merupakan komplikasi dari *acne*, baik *acne* non-inflamasi maupun inflamasi. Ada empat tipe *scar*

karena *acne*, yaitu : *scar icepick*, *rolling*, *boxcar*, dan hipertropik (Afriyanti, 2015).

### 2.6.1 Etiologi dan faktor resiko

Menurut Penelitian Kabau S pada tahun 2012 Penyebab timbulnya *Acne vulgaris* sampai saat ini belum diketahui secara jelas. Tetapi sudah pasti disebabkan oleh multifaktorial, baik yang berasal dari luar maupun dari dalam (Afriyanti, 2015) diantaranya adalah sebagai berikut:

#### a. Genetik

*Acne* kemungkinan besar merupakan penyakit genetik dimana pada penderita terdapat peningkatan respon unit pilosebaceus terhadap kadar normal androgen dalam darah.

#### b. Faktor Hormonal

Pada 60–70% wanita lesi *acne* menjadi lebih aktif kurang lebih satu minggu sebelum haid oleh karena hormon progesteron. Estrogen dalam kadar tertentu dapat menekan pertumbuhan *acne* karena menurunkan kadar gonadotropin yang berasal dari kelenjar hipofisis. Hormon Gonadotropin mempunyai efek menurunkan produksi sebum. Progesteron dalam jumlah fisiologis tidak mempunyai efek terhadap efektifitas terhadap kelenjar lemak. Produksi sebum tetap selama siklus menstruasi, akan tetapi kadang progesteron menyebabkan *acne* premenstrual.

#### c. Makanan (diet)

Terdapat makanan tertentu yang memperberat *Acne vulgaris*. makanan tersebut antara lain adalah makanan tinggi lemak (gorengan, kacang, susu, keju, dan sejenisnya), makanan tinggi karbohidrat (makanan manis, coklat, dll), alkohol, makanan pedas, dan makanan tinggi yodium (garam). Lemak dalam makanan dapat mempertinggi kadar komposisi sebum.

#### d. Faktor Kosmetik

Kosmetika dapat menyebabkan *acne* seperti bedak dasar (*foundation*), pelembab (*moisturiser*), krem penahan sinar matahari (*sunscreen*) dan krem malam, jika mengandung bahan-bahan komedogenik. Bahan-bahan komedogenik seperti lanolin, petrolatum, minyak atsiri dan bahan kimia murni (asam oleik, butil stearat, lauril alkohol, bahan pewarna biasanya terdapat pada krim-krim wajah. Untuk jenis bedak yang sering menyebabkan *acne* adalah bedak padat (*compact powder*).

#### e. Faktor infeksi dan Trauma

Peradangan dan infeksi di folikel pilosebacea terjadi karena adanya peningkatan jumlah dan aktivitas flora folikel yang terdiri dari *Propionibacterium Acnes*, *Corynebacterium Acnes*, *Pityrosporum ovale* dan *Staphylococcus epidermidis*. Bakteri-bakteri ini berperan dalam proses kemotaksis inflamasi dan pembentukan enzim lipolitik yang mengubah fraksi lipid sebum. *Propionibacterium Acnes* berperan dalam iritasi epitel folikel dan mempermudah terjadinya acne. Selain itu, adanya trauma fisik berupa gesekan maupun tekanan dapat juga merangsang timbulnya *acne vulgaris*. Keadaan tersebut dikenal sebagai *acne* mekanika, dimana faktor mekanika tersebut dapat berupa Gesekan, tekanan, peregangan, garukan, dan cubitan pada kulit.

#### f. Kondisi Kulit

Kondisi kulit juga berpengaruh terhadap *acne vulgaris*. Ada empat jenis kulit wajah, yaitu :

- a. Kulit normal, seperti: kulit tampak segar, sehat, bercahaya, berpori halus, tidak berjerawat, tidak berpigmen, tidak berkomedo, tidak bernoda, elastisitas baik.
- b. Kulit berminyak, seperti: mengkilat, tebal, kasar, berpigmen, berpori besar.
- c. Kulit kering, seperti: Pori-pori tidak terlihat, kencang, keriput, berpigmen.
- d. Kulit Kombinasi, seperti: dahi, hidung, dagu berminyak, sedangkan pipi normal/kering atau sebaliknya.

## 2.7 Bakteri

Bakteri adalah sel prokariot yang mempunyai inti yang tidak sempurna. Reproduksi terutama dengan pembelahan biner sederhana yaitu suatu proses aseksual. Morfologi bakteri terdiri dari tiga bentuk, yaitu sferis (kokus), batang (basil) dan spiral. Ukuran bakteri bervariasi tetapi pada umumnya berdiameter sekitar 0,5-1,0  $\mu\text{m}$  dan panjang 1,5-2,5  $\mu\text{m}$  (Soedarto, 2015; Subandi, 2014).

### 2.7.1 Pertumbuhan Bakteri

Pertumbuhan dapat didefinisikan sebagai penambahan secara teratur semua komponen di dalam sel hidup, dengan demikian penambahan ukuran yang diibaratkan oleh bertambahnya air atau karena penumpukan lemak, bukan merupakan pertumbuhan. Pertumbuhan sel diartikan sebagai adanya penambahan volume sel serta bagian-bagian

sel lainnya; dapat juga diartikan sebagai penambahan kuantitas isi dan kandungan di dalam sel, sedangkan pertumbuhan populasi merupakan akibat pertumbuhan individu. Misalnya dari satu sel menjadi dua, dari dua sel menjadi empat, dari empat sel menjadi delapan sel, dan seterusnya (Waluyo, 2007).

Bakteri patogen bagi manusia umumnya tumbuh dengan baik pada suhu 37°C dengan pH 6,5-7,5. Tidak semua bakteri memerlukan oksigen, berdasarkan kebutuhan terhadap oksigen untuk pertumbuhan dan hidupnya organisme dikelompokkan menjadi: (Soedarto, 2015)

- a. *Aerob*, hanya dapat hidup jika selalu tersedia oksigen.
  - b. *Aerob obligat*, tidak dapat hidup jika tidak ada oksigen bebas.
  - c. *Aerob fakultatif*, organisme dapat hidup baik ada atau tidak ada oksigen, tetapi tumbuh lebih baik jika ada oksigen.
  - d. *Anaerob obligat*, organisme hanya bisa hidup jika tidak ada oksigen bebas.
  - e. *Anaerob fakultatif*, organisme dapat hidup baik jika tidak ada oksigen.
  - f. *Micro-aerophile*, organisme hidup lebih baik pada keadaan oksigen yang rendah.
- Kurva pertumbuhan bakteri dibagi menjadi beberapa fase, yaitu (Pratiwi, T, 2008).

#### 1. Fase Lag

Fase lag adalah fase adaptasi, yaitu fase penyesuaian mikroorganisme pada kondisi lingkungan baru. Seperti tidak adanya peningkatan jumlah sel, yang ada hanyalah peningkatan ukuran sel. Lama fase lag bergantung pada kondisi dan jumlah awal mikroorganisme dan media pertumbuhan. Bila sel-sel mikroorganisme diambil dari kultur yang sama sekali berlainan, maka yang sering terjadi adalah mikroorganisme tersebut tidak mampu tumbuh dalam kultur.

#### 2. Fase Log (fase eksponensial)

Fase log merupakan fase dimana mikroorganisme tumbuh dan membelah pada kecepatan maksimum, tergantung pada genetika mikroorganisme, sifat media, dan kondisi pertumbuhan. Sel baru terbentuk dengan laju konstan dan massa yang bertambah secara eksponensial. Hal yang dapat menghambat laju pertumbuhan adalah bila satu atau lebih nutrisi dalam kultur habis, sehingga hasil metabolisme yang bersifat racun akan tertimbun dan menghambat pertumbuhan.

### 3. Fase Stasioner

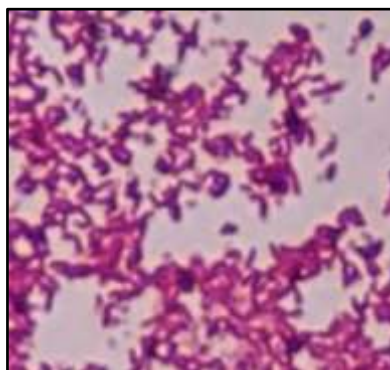
Fase stasioner merupakan pertumbuhan mikroorganisme berhenti dan terjadi keseimbangan antara jumlah sel yang membelah dengan jumlah sel yang mati. Pada fase ini terjadi akumulasi produk buangan yang toksik. Pada sebagian besar kasus, pergantian sel terjadi dalam fase stasioner ini. Terdapat kehilangan sel yang lambat karena kematian diimbangi oleh pembentukan sel-sel baru melalui pertumbuhan dan pembelahan dengan nutrisi yang dilepaskan oleh sel – sel yang mati karena mengalami lisis.

### 4. Fase Kematian

Fase kematian merupakan jumlah sel yang mati meningkat. Faktor penyebabnya adalah ketidakterersediaan nutrisi dan akumulasi produk buangan yang toksik.

#### 2.7.2 Morfologi dan Klasifikasi *Propionibacterium acnes*

*Propionibacterium acnes* merupakan bakteri flora normal pada kulit, biasanya bakteri ini terdapat pada folikel sebasea. Tidak hanya itu, *Propionibacterium acnes* juga dapat ditemukan pada jaringan manusia, paru-paru, dan jaringan prostat. Kulit merupakan habitat utama dari *Propionibacterium acnes*, namun dapat juga diisolasi dari rongga mulut, saluran pernafasan bagian atas, saluran telinga eksternal, konjungtiva, usus besar, uretra, dan vagina. *Propionibacterium acnes* termasuk bakteri Gram positif, pleomorfik, dan bersifat anaerob aerotoleran. *Propionibacterium acnes* memiliki lebar 0,5-0,8  $\mu\text{m}$  dan panjang 3-4  $\mu\text{m}$  dengan waktu inkubasi selama 24 jam, bakteri ini dengan bentuk batang, ujung meruncing atau kokoid (bulat) (Oprica, 2007). Morfologi bakteri *P.acne* dapat dilihat pada Gambar 2.7.



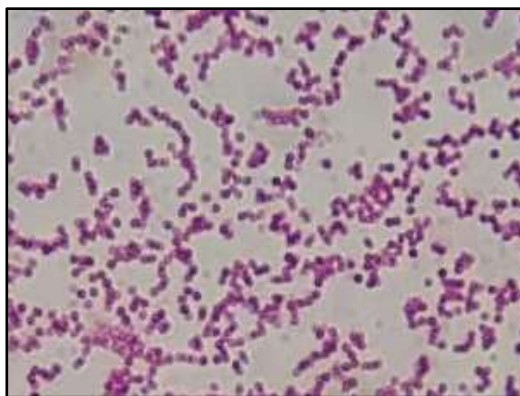
**Gambar 2.7** Bakteri *Propionibacterium acne* (Dokumen Pribadi)

Klasifikasi *P. acnes* menurut Cronquist (1981) adalah sebagai berikut:

Kerajaan : Bacteria  
 Fillum : Actinobacteria  
 Suku : Actinomycetales  
 Bangsa : Propionibacteriaceae  
 Marga : Propionibacterium  
 Jenis : *Propionibacterium acnes*

### 2.7.3 Morfologi dan Klasifikasi *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* merupakan bakteri gram positif kokus bergerombol dengan diameter 1  $\mu\text{m}$ . Morfologi *S.aueus* dapat dilihat pada Gambar 2.9. *S.aureus* merupakan bakteri koagulase positif, banyak terdapat di bagian axial dan saluran hidung. *S.aureus* mengekspresikan berbagai protein ekstraselular dan polisakarida, beberapa di antaranya berkorelasi dengan virulensi. Virulensi dihasilkan dari efek gabungan dari banyak factor virulensi potensial, seperti (1) protein permukaan yang mempromosikan kolonisasi pada jaringan inang. (2) faktor-faktor yang mungkin menghambat fagositosis. (3) racun yang dapat merusak jaringan inang dan menyebabkan gejala penyakit (Foster,1996). Morfologi bakteri *S.aureus* dapat dilihat pada Gambar 2.8.



**Gambar 2.8** Bakteri *Staphylococcus aureus* (Dokumen Pribadi)

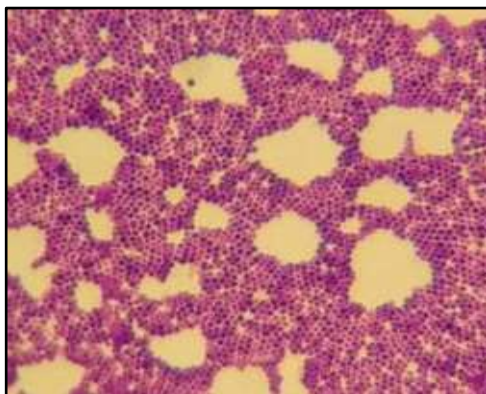
Klasifikasi *S.aureus* menurut ITIS adalah sebagai berikut :

Kingdom : Bacteria  
 Phylum : Posibacteria  
 Class : Bacilli  
 Family : Bacillales

Ordo : Staphylococceae  
 Genus : Staphylococcus  
 Spesies : *Staphylococcus aureus*

#### 2.7.4 Morfologi dan Klasifikasi *Staphylococcus epidermidis*

*Staphylococcus epidermidis* merupakan bakteri oportunistik yang menyerang individu ketika sistem tubuh lemah. Ciri-ciri dari bakteri *Staphylococcus epidermidis* adalah berbentuk kokus, berdiameter 0,5-1,5  $\mu\text{m}$ . *S. epidermidis* berkoloni mengerombol menyerupai buah anggur, koloni biasanya berwarna putih atau krem. Bakteri ini merupakan Gram positif (Pramasanti, 2008). *S. epidermidis* bersifat aerob fakultatif. Bakteri ini tidak memiliki protein A pada dinding selnya. Bersifat koagulasi negatif, dalam keadaan anaerob tidak meragi manitol (Todar, 2011). Adapun morfologi *S. epidermidis* dapat dilihat pada Gambar 2.9.



**Gambar 2.9** Bakteri *Staphylococcus epidermidis* (Dokumen Pribadi)

Klasifikasi *S. epidermidis* menurut ITIS adalah sebagai berikut:

Kerajaan : Bacteria  
 Filum : Firmicutes  
 Kelas : Bacili  
 Suku : Bacillales  
 Bangsa : Staphylococcaceae  
 Marga : Staphylococcus  
 Jenis : *Staphylococcus epidermidis*

## 2.8 Antibakteri

### 2.8.1 Mekanisme Kerja Antibiotik

Antibakteri bekerja dengan memakai salah satu cara dari beberapa mekanisme, melalui toksisitas selektif, melalui penghambatan sintesis dan fungsi membran sel, melalui inhibisi sintesis protein, atau melalui inhibisi sintesis asam nukleat (Brooks, F *et.al*, 2010).

#### a. Toksisitas Selektif

Agen antimikroba yang ideal memiliki toksisitas selektif yang artinya obat tersebut mencederai patogen, tetapi tidak berbahaya bagi pejamu. Sering kali toksisitas selektif bersifat relatif bukan absolut, maksudnya, suatu obat dalam konsentrasi yang dapat ditoleransi pejamu, dapat merusak mikroorganisme penyebab infeksi. Toksisitas selektif mungkin merupakan fungsi suatu reseptor spesifik yang diperlukan untuk pelekatan obat, atau mungkin bergantung pada inhibisi peristiwa biokimiawi yang esensial bagi patogen, tetapi tidak esensial bagi pejamu (Brooks, F *et al.*, 2010).

#### b. Inhibisi Sintesis Dinding Sel

Bakteri memiliki lapisan luar yang kaku, yaitu dinding sel. Dinding sel mengandung polimer mukopeptida (peptidoglikan) yang secara kimiawi dan tersusun atas polisakarida-polisakarida dan suatu polipeptida yang kaya ikatan silang. Ketakutan pada dinding sel ini merupakan peran dari ikatan silang rantai- rantai peptide (misalnya, melalui ikatan silang pentaglisin) sebagai akibat dari reaksi transpeptidasi yang dilangsungkan oleh beberapa enzim. Inhibisi enzim transpeptidase (reaksi transpeptidase) oleh penisilin dan sefalosporin mungkin disebabkan oleh kesamaan struktur obat tersebut dengan *acyl-d-alanyl-d-alanine*. Reaksi transpeptidasi melibatkan pemutusan *d-alanine* dari pentapeptida itu (Brooks, F *et.al*, 2010).

#### c. Inhibisi Fungsi Membran Sel

Sitoplasma pada semua sel hidup dibungkus oleh membran sitoplasma yang berperan sebagai sawar berpermeabilitas selektif, melakukan fungsi transportasi aktif dan mengatur komposisi internal sel. Kelas ketiga agen yang aktif terhadap membran sel yaitu ionofor, senyawa-senyawa yang memungkinkan difusi cepat kation yang spesifik untuk melewati membran. Ionofor dapat membunuh sel dengan cara menghilangkan beda potensial membran yang penting bagi fosfolirasi oksidatif, dan juga untuk proses lain

yang dimediasi membran, mereka tidak selektif untuk bakteri, tetapi bekerja pada membran semua sel (Brooks, F *et al.*, 2010).

#### d. Inhibisi Sintesis Protein

Diketahui bahwa eritromisin, linkomisin, tetrasiklin, aminoglikosida dan kloramfenikol dapat menghambat sintesis protein pada bakteri, tetapi mekanisme kerja yang pasti bagi obat tersebut masih belum diketahui dengan jelas (Brooks, F *et al.*, 2010).

#### e. Inhibisi Sintesis Asam Nukleat

Contoh obat-obatan bekerja dengan menghambat sintesis asam nukleat adalah golongan kuinolon, pirimetamin, rifampisin, sulfonamide, trimetoprim dan trimetreksat (Brooks, F *et al.*, 2010).

## 2.9 Uji Aktivitas Antibakteri

Terdapat bermacam – macam metode uji antimikroba seperti berikut: (Pratiwi, T, 2008)

### 2.9.1 Metode Difusi

#### a. Metode *Disc Diffusion*

Metode *disc diffusion* untuk menentukan aktivitas agen antimikroba. Piringan yang berisi agen antimikroba diletakkan pada media Agar yang telah ditanami mikroorganisme yang akan berdifusi pada media Agar tersebut. Area jernih mengindikasikan adanya hambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh agen antimikroba pada permukaan media Agar (Pratiwi, T, 2008).

#### b. E – Test

Metode E – test digunakan untuk mengestimasi KHM (Kadar Hambat Minimum), yaitu konsentrasi minimal suatu agen antimikroba untuk dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme (Pratiwi, T, 2008).

Pada metode ini digunakan strip plastik yang mengandung agen antimikroba dari kadar terendah hingga tertinggi yang diletakkan pada permukaan media Agar yang telah ditanami mikroorganisme. Pengamatan dilakukan pada area jernih yang ditimbulkannya yang menunjukkan kadar agen antimikroba yang menghambat pertumbuhan

mikroorganisme pada media Agar (Pratiwi, T, 2008).

*c. Ditch-Plate Technique*

Pada metode ini sampel uji berupa agen antimikroba yang diletakkan pada parit yang dibuat dengan cara memotong media Agar dalam cawan petri pada bagian tengah secara membujur dan mikroba uji (maksimum 6 macam) digoreskan ke arah parit yang berisi agen antimikroba (Pratiwi, T, 2008).

*d. Cup-Plate Technique*

Metode ini serupa dengan metode *disc diffusion*, di mana dibuat sumur pada media Agar yang telah ditanami dengan mikroorganisme dan pada sumur tersebut diberi agen antimikroba yang akan diuji (Pratiwi, T, 2008).

*e. Gradient-Plate Technique*

Pada metode ini konsentrasi agen antimikroba pada media Agar secara teoritis dan permukaan media mengering. Mikroba uji maksimal 6 macam) digoreskan pada arah mulai dari konsentrasi tinggi ke rendah. Hasil diperhitungkan sebagai panjang total pertumbuhan mikroorganisme maksimum yang mungkin dibandingkan dengan panjang pertumbuhan hasil goresan (Pratiwi, T, 2008). Pembagian kekuatan daya antibakteri menjadi 4 kategori disajikan dalam Tabel 2.1

**Tabel 2.1** Kategori Daya Hambat Bakteri

Daya Hambat Bakteri	Kategori
<5 mm	Lemah
5-10 mm	Sedang
10-20 mm	Kuat
>20 mm	Sangat Kuat

Sumber : (Putri Andini Rahmah *et al.*, 2017)

## 2.9.2 Metode Dilusi

Metode dilusi dibedakan menjadi dua yaitu dilusi cair (*Broth dilution*) dan dilusi padat (*Solid dilution*) (Pratiwi, T, 2008) :

a. Metode Dilusi Cair / *Broth Dilution Test (Serial Dilution)*

Metode ini mengukur KHM dan KBM. Cara yang dilakukan adalah membuat seri pengenceran agen antimikroba pada medium cair yang ditambahkan dengan mikroba uji. Larutan uji agen antimikroba pada kadar terkecil yang terlihat jernih tanpa adanya pertumbuhan mikroba uji ditetapkan sebagai KHM. Larutan yang ditetapkan sebagai KHM tersebut selanjutnya dikultur ulang pada media cair tanpa penambahan mikroba uji ataupun agen antimikroba, dan diinkubasi selama 18-24 jam. Media cair yang tetap jernih setelah inkubasi, ditetapkan sebagai KBM (Pratiwi, T, 2008).

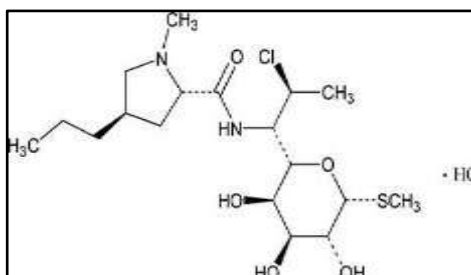
b. Metode Dilusi Padat / *Solid Dilution Test*

Metode ini serupa dengan metode dilusi cair namun menggunakan media padat (solid). Keuntungan metode ini adalah satu konsentrasi agen antimikroba yang diuji dapat digunakan untuk menguji beberapa mikroba uji (Pratiwi, T, 2008).

## 2.10 Antibakteri Pemandang

Karakteristik Klindamisin hidroklorida yang digunakan sebagai antibakteri pemandang adalah sebagai berikut (Indonesia, 2014) :

a. Rumus bangun



**Gambar 2.10** Rumus Bangun Klindamisin hidroklorida (Depkes, 2014)

c. Rumus kimia :  $C_{18}H_{33}ClN_2O_5S \cdot HCl$ .

d. Nama lain : Metil 7-kloro-6,7,8-trideoksi-6-(1-metil-trans-4-propil-L2pirolidinakarboxamido)-1-tio-L-tro- $\alpha$ -D-galakto-oktopiranosida monoklorida [21462-39-5].

e. Pemerian : Serbuk hablur; putih atau praktis putih; tidak berbau atau bau lemah seperti merkaptan. Stabil di udara dan cahaya. Larutan bersifat asam dan memutar bidang polarisasi ke kanan.

f. Kelarutan : Larut dalam air, dalam dimetilformamida dan dalam metanol; larut dalam

etanol; praktis tidak larut dalam aseton.

g. Wadah penyimpanan : Dalam wadah tertutup rapat.

Klindamisin merupakan antibiotika topikal yang biasa digunakan pada *acne*. Antimikroba lain yang biasa digunakan dalam pengobatan *acne* antara lain eritromisin, benzoil peroksida dan kombinasi antibiotik benzoil peroksida (benzamyacin, benzaclin, dan lain – lain). Klindamisin berikatan secara eksklusif pada subunit 50 S ribosom bakteri dan menekan sintesis protein. Klindamisin lebih aktif daripada eritromisin atau klaritromisin terhadap bakteri anaerob, terutama *B.fragilis*. beberapa galur dihambat oleh konsentrasi  $<0,1 \mu\text{g/mL}$ , dan lebih dari 90% galur dihambat oleh  $2 \mu\text{g/mL}$  (Brunton *et al.*, 2008).

## 2.11 Metode Isolasi dan Pemurnian

Kromatografi merupakan salah satu prosedur pemisahan dan pemurnian suatu senyawa yang didasarkan atas prinsip distribusi partikel dalam fase diam dan fase gerak. Fase diam yang umum digunakan adalah silika gel atau selulosa, sedangkan fase gerak merupakan kombinasi beberapa pelarut organik untuk mencapai tingkat kepolaran tertentu (Coskun, 2016). Berdasarkan bentuknya kromatografi dapat dibedakan menjadi dua jenis, kromatografi KLT dan kromatografi kolom.

### 2.11.1 Kromatografi Kolom

Kromatografi kolom menghasilkan resolusi yang lebih tinggi daripada metode pemurnian lainnya dan dengan demikian lebih efisien dalam hal pemurnian protein. Kolom kaca atau logam digunakan untuk mengemas fase diam. Fase diam dilapisi dengan partikel kecil dan dikemas ke dalam kolom atau diolesi sebagai film tipis di dinding bagian dalam kolom. Setelah aplikasi campuran analit, eluen dilewatkan melalui kolom baik dengan menggunakan sistem pemompaan atau tekanan gas yang diterapkan. Analit dipisahkan berdasarkan koefisien distribusinya saat eluen mengalir melalui kolom. Terdapat dua jenis eluasi yaitu eluasi isokratik (menggunakan komposisi pelarut yang konstan) dan eluasi gradien (Komposisi fase gerak (pH, konsentrasi garam, atau polaritas) diubah terus menerus atau secara bertahap untuk memfasilitasi pemisahan). Mereka muncul satu per satu di eluen saat meninggalkan kolom (Coskun, 2016).

### 2.11.2 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) adalah metode pemisahan fisikokimia yang didasarkan atas penjerapan, partisi, atau gabungannya. KLT merupakan salah satu teknik kromatografi yang banyak digunakan untuk analisis kualitatif senyawa organik, isolasi senyawa tunggal dari campuran multikomponen, analisis kuantitatif, dan isolasi skala preparatif (Waksmundzka-Hajnos, Sherma, Kowalska, 2008). Teknik KLT sangat bermanfaat untuk analisis obat dan bahan lain dalam laboratorium karena hanya memerlukan peralatan sederhana, waktu yang cukup singkat, dan jumlah zat yang diperiksa cukup kecil (Stahl, 1969; Harmita, 2006).

### 2.12 Rekrystalisasi

Senyawa bahan alam yang berbentuk padat hasil dari isolasi suatu tanaman seringkali terkontaminasi oleh pengotor. Teknik rekrystalisasi umum digunakan untuk memurnikan senyawa tersebut dari pengotornya. Pemurnian dengan cara rekrystalisasi didasarkan pada perbedaan kelarutan dalam keadaan panas atau dingin pada suatu pelarut. Peningkatan temperatur dapat membantu proses kelarutan suatu senyawa. Pembentukan kembali kristal terjadi saat senyawa didinginkan hingga mencapai kondisi jenuh.

Secara umum proses rekrystalisasi memiliki tujuh tahapan yang terdiri dari; pemilihan pelarut yang sesuai dengan senyawa target, melarutkan zat terlarut dengan pelarut yang sesuai, menghilangkan pengotor yang terdapat pada larutan, memindahkan zat padat dengan cara penyaringan, mengkrystalakan larutan dengan cara didinginkan, mengumpulkan dan mencuci kristal menggunakan cara filtrasi, dan yang terakhir mengeringkan produk/ hasil rekrystalisasi (Kristanti, dkk. 2019). Pemilihan pelarut merupakan merupakan salah satu faktor terpenting dalam proses rekrystalisasi. Syarat pelarut yang akan digunakan pada proses rekrystalisasi:

- a. Pelarut harus inert tidak mempengaruhi dan beraksi dengan senyawa yang dilarutkan
- b. Zat terlarut pada pelarut dengan bantuan pemanasan
- c. Pelarut selektif
- d. Pelarut mudah diuapkan dan dihilangkan dari zat terlarut (Pinalia, A. 2011).

## 2.13 Karakterisasi senyawa murni

Karakterisasi yang dilakukan terhadap senyawa murni diantaranya dengan analisis fisika yakni dengan penentuan titik leleh, analisis fisiko kimia dengan menggunakan alat spektrofotometer UV-VIS, spektrofotometer inframerah, spektrometer resonansi magnet inti proton, karbon, 2D-NMR (HMQC dan HMBC) dan spektrometer massa.

### 2.13.1 Spektrofotometer UV-VIS

Spektrofotometer ultraviolet (UV-VIS) digunakan untuk analisa kualitatif dan analisa kuantitatif namun penggunaannya dalam penentuan struktur senyawa organik masih terbatas. Senyawa-senyawa yang dapat dianalisa dengan spektrofotometer UV-VIS adalah senyawa-senyawa yang mempunyai gugus kromofor.

Spektrofotometer UV-VIS digunakan untuk mengukur transisi-transisi diantara tingkatan-tingkatan elektronik. Transisi tersebut biasanya antara orbital ikatan (orbital pasangan bebas) dengan orbital non ikatan (orbital anti ikatan). Keuntungan selektif dari spektrofotometer UV-VIS adalah dapat menentukan gugus karakteristik dalam molekul-molekul yang sangat kompleks. Parameter yang diperoleh dari spektrofotometer UV-VIS adalah harga panjang gelombang maksimum ( $\lambda_{\text{mak}}$ ) dan absorban (A) dari senyawa yang dianalisa.

### 2.12.2 Spektrofotometer Inframerah

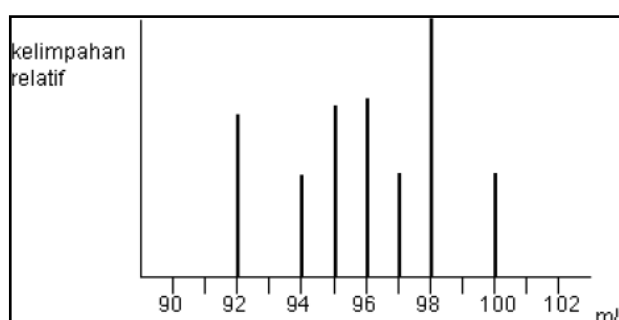
Spektrofotometer inframerah digunakan untuk menentukan gugus fungsi yang terdapat pada senyawa organik tapi penggunaannya dalam penentuan struktur senyawa organik masih terbatas. Hampir semua senyawa organik mengandung ikatan C-H dan ini berarti bahwa selalu ada pita absorpsi dalam spektrum infra merah antara 2900 dan 3100  $\text{cm}^{-1}$  pada frekuensi peregangan C-H. Molekul umumnya memiliki sejumlah besar ikatan dan masing-masing ikatan memiliki mode vibrasi inframerah. Spektrum infra merah sangat kompleks dan memiliki banyak pita penyerapan yang tumpang tindih (*overlapping*). Spektrum inframerah cukup kompleks sehingga spektrum untuk masing-masing senyawa adalah unik dan ini membuat spektrum inframerah sangat berguna untuk mengidentifikasi senyawa dengan melakukan perbandingan langsung dengan spektrum dari sampel asli (*fingerprinting*). Vibrasi infra merah sangat dipengaruhi oleh perubahan kecil dalam struktur molekul, sehingga sulit untuk mengidentifikasi fragmen struktural dari data spektra inframerah saja (Field, Sternhell, & Kalman, 2013). Parameter yang

ditentukan adalah bilangan gelombang ( $\text{cm}^{-1}$ ) dari puncak- puncak yang muncul pada spektrum inframerah.

### 2.13.3 Spektrometer Massa

Spektroskopi massa adalah teknik analisis untuk menentukan komposisi dasar dari suatu sampel atau molekul. Spektrometer massa digunakan untuk penentuan berat molekul suatu senyawa. Prinsipnya adalah ionisasi senyawa kimia untuk menghasilkan muatan atau fragmen molekul dan penentuan massa per muatan.

Alat spektrometer massa terdiri dari tiga bagian, yakni: 1). Sumber ion, yang dapat merubah fase sampel menjadi ion. 2). Elektromagnetik, yang memisahkan ion dari massa. 3). Bagian detektor, yang menentukan nilai dari jumlah indikator yang menyediakan data untuk perhitungan keberadaan ion yang ada. Ketika susunan ion telah terpisah dan tercatat, keluarannya dikenal sebagai spektrum massa. Spektrum massa merupakan catatan kelimpahan setiap ion yang mencapai detektor (William, & Fleming, 2014). Spektrometer massa dapat digunakan untuk keperluan kualitatif dan kuantitatif. Gambar spektrum massa ditunjukkan pada Gambar 2.11.



**Gambar 2.11** Spektrum Massa (Jenie, U. A., dkk., 2014)

### 2.13.4 Spektrometer Resonansi Magnet Inti (NMR)

Resonansi Magnet Inti adalah sifat suatu magnet inti yang terdapat pada ruang dan pancaran elektromagnetik yang menyebabkan inti menyerap energi dari elektromagnetik dan memancarkan energi tersebut ke luar. Radiasi energi tersebut adalah pada frekwensi resonansi spesifik yang tergantung dengan kekuatan medan magnet dan faktor lainnya. Hal ini menyebabkan observasi spesifik sifat kuantum mekanis magnet dari suatu inti atom. Teknik ini dapat memberikan informasi detail mengenai topologi, dinamika dan struktur tiga dimensi molekul dalam larutan ataupun dalam bentuk padat.

Teknik NMR-2D seperti HMQC dan HMBC dapat digunakan dalam pendeteksian korelasi proton dengan karbon.

a. H NMR

Spektrum H NMR dapat memberikan informasi spesifik tentang jumlah atom H dalam senyawa melalui nilai integrasinya. Nilai integrasi juga dapat menentukan bentuk konformasi proton *cis* atau *trans*, *axial* atau *equatorial*. Setiap gugus fungsi memberikan gambaran yang khas, sehingga melalui informasi pergeseran kimia ( $\delta$ ) dan kopling konstan (J) jumlah dan letak gugus fungsi (orto, meta, atau para) dapat diketahui.

b. C NMR

Spektrum C NMR memberikan informasi jumlah atom karbon (C) yang terdapat di dalam senyawa beserta jenis ikatannya (primer, sekunder, tersier, atau kuarternar). Spektra ini juga memberikan pergeseran kimia yang khas pada gugus fungsi tertentu, misal pada gugus aromatik muncul pada pergeseran antara 110- 160 nm, ikatan rangkap 100-150 nm, gugus metil 10-30 nm, dan lain-lain.

c. HMQC

Spektrum HMQC merupakan spektrum NMR 2 dimensi yang menunjukkan hubungan ikatan antara atom proton (H) dalam satu ikatan atom karbon.

d. HMBC

Spektrum HMBC merupakan spektrum NMR 2 dimensi yang menunjukkan hubungan antara atom H dan C yang berjarak 2 sampai 3 ikatan (Jenie, U. A., dkk., 2014).



## **BAB 3**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **3.1 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Penelitian Fitokimia dan Laboratorium Penelitian Mikrobiologi, Fakultas Farmasi, Universitas Indonesia, Depok dan di Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN), Serpong. Penelitian dilakukan Agustus 2021 sampai Mei 2022.

#### **3.2 Bahan**

##### **3.2.1 Bahan Tanaman**

Mimba (*Azadirachta indica*) yang diperoleh dari Desa Jatiluhur, Kota Bekasi dan dideterminasi oleh Badan Riset dan Inovasi (BRIN), Bogor. Daun adalah bagian yang digunakan dalam penelitian ini.

##### **3.2.2 Bahan Kimia**

Media *Brain Heart Infusion Borth* (Oxoid), *Blood agar* (Oxoid), *Nutrient Agar* (Himedia), natrium klorida 0,9% (*Otsu - NS*), etil asetat (teknis), *Mc Farland 3* (*Remel*), *Iugol's iodine* (*Merck*), *safranin* (*Merck*), etanol 96% (*Brataco*), aquadest (*Brataco*), *klindamisin* (BPOM); lempeng KLT (*Merck*); metanol teknis; *n*-heksana teknis; dan silika gel (*Merck*).

##### **3.2.3 Bahan Bakteri**

Bakteri yang digunakan adalah *Propionibacterium acnes* ATCC 11827 yang didapat dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta. *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 didapat dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Farmasi Universitas Indonesia, Depok.

#### **3.3 Peralatan**

Alat-alat gelas, *blue tip*, botol penampung ukuran 100 ml, *chamber* KLT (Camag), kertas saring, kolom kromatografi, lemari pendingin (Sharp), lempeng KLT (Merck cat. 1.05554, Jerman), silika gel (Merck cat. 1.07734, Jerman), *microplate 96- well* (Biologix), pipa kapiler, Rotavapor R-300 (Buchi, Jerman), spektrofotometer UV-Vis (Hitachi U 2000, Jepang), spectrometer infra merah (Shimadzu IR Prestige 21, Jepang),

spektrometer resonansi magnetik inti (Jeol JNM-ECA 500 MHz, USA), timbangan analitik (Mettler Toledo), GC-MS (Perkin Elmer Clarus 5000, USA), *yellow tip*, blender (*Philips*), *hot plate stirrer*, *spatula*, batang pengaduk, pinset, aluminium foil, pipet tetes, toples kaca, incubator (Lab Line Imperial III), *laminar air flow* (ESCO®), jarum ose, bunsen, mikropipet (Gilson), tabung reaksi (*pyrex*), rak tabung reaksi, *vortex* (Barnstead-Thermolyne), waterbath (Lab-Line Imperial IV®), gunting, beaker glass (*pyrex*), gelas ukur (*pyrex*), objek glass dan cover glass, anaerob jar (Locknlock), botol vial 10ml.

### **3.4 Prosedur Penelitian**

#### **3.4.1 Penyiapan Simplisia**

Daun mimba yang diperoleh dari Desa Jatiluhur, Kota Bekasi. Bahan uji tersebut dideterminasi keasliannya di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Cibinong Bogor. Bahan uji dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Setelah kering, kemudian dihaluskan dengan blender. Serbuk kering yang diperoleh kemudian ditimbang.

#### **3.4.2 Pembuatan Ekstrak**

Proses ekstraksi dilakukan menggunakan metode *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE). Ekstraksi dilakukan secara sekuensial dengan menggunakan pelarut n-heksan, etil asetat, dan metanol. Sebanyak 50 g serbuk kering daun mimba dimasukkan ke beaker glass 1000 mL, kemudian ditambahkan pelarut heksan 500mL dengan waktu selama 30 menit. Ekstraksi diulang sebanyak 3 kali untuk mendapatkan rendemen yang maksimal. Filtrat dipisahkan menggunakan kertas saring, kemudian diuapkan menggunakan rotary evaporator hingga mendapatkan ekstrak heksan. Serbuk daun yang telah diekstraksi menggunakan n-heksan dikeringkan, dan dengan cara yang sama dilanjutkan proses ekstraksi menggunakan pelarut etil asetat dan metanol. Ekstrak kering yang didapatkan dikumpulkan dan diletakkan didalam botol kaca untuk dilakukan pengujian selanjutnya. Ekstrak n-heksan yang peroleh disebut sebagai (ENH), Ekstrak etil asetat (EEA) dan Metanol (EME).

### **3.5 Uji Antibakteri**

#### **3.5.1 Sterilisasi Alat**

Sterilisasi dilakukan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C tekanan 1 atm selama 15-20 menit (Safitri & Novel, 2010). Semua alat dan bahan sebelum

disterilisasi dibungkus terlebih dahulu dengan kertas coklat, kemudian dimasukkan kembali ke dalam plastik tahan panas. Untuk bahan yang terbuat dari karet seperti pipet tetes disterilisasi dengan cara memasukkan larutan uji atau medium ke dalam wadah yang sesuai yaitu tabung reaksi atau erlemeyer, kemudian wadah disumbat yang sesuai atau dengan kapas kemudian disterilisasi dengan autoklaf.

### 3.5.2 Pembuatan Media

Sebanyak 3 g serbuk *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB) dilarutkan dalam air aquadest sedikit demi sedikit kemudian volumenya dicukupkan hingga 100 mL dengan bantuan pemanasan sampai semua bahan larut sempurna, kemudian disterilkan di autoklaf pada suhu 121<sup>0</sup>C selama 15 menit.

Sebanyak 40 g *Blood Agar* (BA) dilarutkan ke dalam 1000 mL aquadest, kemudian dipanaskan hingga larut. Kemudian ditunggu hingga agak dingin sekitar suhu 40-45<sup>0</sup>C media yang telah dingin kemudian nantinya akan dituang ke cawan petri sebanyak 15 mL. Medium BA yang telah dituang ke dalam cawan petri dibiarkan hingga memadat (Mahmudah & Atun, 2017).

Sebanyak 2 g *Nutrient Agar* (NA) dilarutkan ke dalam 100 mL aquadest, kemudian dipanaskan hingga larut. Kemudian ditunggu hingga agak dingin sekitar suhu 40-45<sup>0</sup>C media yang telah dingin kemudian nantinya akan dituang ke cawan petri sebanyak 15 mL. Medium NA yang telah dituang ke dalam cawan petri dibiarkan hingga memadat untuk peremajaan bakteri (Juariyah & Sari, 2018).

### 3.5.3 Penapisan Bakteri

Pewarnaan Gram dilakukan dengan cara bakteri uji difiksasi dan diwarnai dengan kristal violet dan didiamkan selama 5 menit. Zat warna dibuang dan diganti dengan larutan *lugol's iodine* (larutan I<sub>2</sub> dan KI) dibiarkan selama 45-60 detik. Larutan *lugol's iodine* dibuang dan sediaan dicuci dengan etanol 96% selama 30 detik atau digoyang-goyangkan sampai tidak ada zat warna yang mengalir lagi. Sediaan dicuci dengan air dan diwarnai dengan safranin selama 1-2 menit. Sediaan dicuci, dikeringkan dan diperiksa di bawah mikroskop. Bakteri Gram positif akan tampak berwarna ungu dan bakteri Gram negatif berwarna merah (Pandey *et al.*, 2014).

### 3.5.4 Peremajaan Bakteri

Bakteri uji diremajakan pada medium *Nutrient Agar* pada bakteri *S. epidermidis*, *S. aureus* sedangkan medium *Blood agar* pada bakteri *P. acne* dengan cara menginokulasi

1 ose biakan murni masing-masing bakteri pada permukaan agar miring, kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam di dalam inkubator (Yanti & Mitika, 2017). Peremajaan bakteri dilakukan pada bakteri yang akan diuji aktivitas dan umur bakteri yang digunakan antara 24 jam.

### 3.5.5 Pembuatan Suspensi Bakteri

Bakteri yang digunakan adalah bakteri yang berumur 24 jam. Bakteri diambil menggunakan jarum ose, kemudian disuspensikan dengan larutan NaCl 0,9%. Kekeruhan diukur menggunakan standar Mc Farland 3 dari oxoid ( $3 \times 10^8$  sel bakteri/ml). Bakteri hasil peremajaan kemudian dibuat suspensi bakteri. Bakteri uji sebanyak 1-2 ose diencerkan ke dalam larutan 5 mL NaCl 0,9%. Kekeruhan dari suspensi bakteri disamakan dengan larutan standar *Mc Farland 3* sehingga hasil bakteri dengan jumlah  $10^9$  CFU/mL. Suspensi bakteri kemudian diencerkan hingga konsentrasinya menjadi  $10^6$  CFU/mL dengan cara sebanyak 1 mL bakteri  $10^9$  dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi 9 mL NaCl 0,9%, suspensi tersebut kemudian dihomogenkan dengan menggunakan vortex, sehingga dihasilkan bakteri  $10^8$  CFU/mL, selanjutnya dilakukan proses yang sama hingga diperoleh bakteri sejumlah  $10^6$  CFU/mL. suspensi yang telah disesuaikan digunakan sebagai inokulum.

### 3.5.6 Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum

Penentuan KHM dilakukan terhadap ekstrak, fraksi dan isolat dengan metode mikrodilusi menggunakan *96-well microplate*. Media *Brain Heart Infusion Borth* (BHIB) dengan campuran ekstrak, fraksi, isolate dan klindamisin sebanyak 100  $\mu$ L ditambahkan pada masing-masing sumuran. Sebanyak 100  $\mu$ L suspensi bakteri masing-masing ditambahkan pada sumuran. Suspensi mikroba yang telah disesuaikan dengan *Mc Farland 3* setara dengan  $3 \times 10^8$  diencerkan hingga konsentrasi  $3 \times 10^6$ . *Microplate* kemudian diinkubasi pada kondisi aerob suhu 37°C selama 24 jam untuk *S.aureus*, dan *S.epidermidis*, sedangkan untuk *P.acne* diinkubasi pada kondisi anaerob pada suhu 37°C selama 72 jam. Pengamatan dilakukan dengan adanya kekeruhan dan dibandingkan dengan larutan control positif. Konsentrasi paling rendah yang tidak menunjukkan kekeruhan (jernih) adalah nilai KHM. Uji ini dilakukan dua kali.

Perhitungan penimbangan sampel di bawah ini:

#### a. Pembuatan Sampel Ekstrak

Sebanyak 100 mg ekstrak ditimbang dan dilarutkan dengan pelarut DMSO 300  $\mu$ L

untuk ekstrak n-heksan, sebanyak 100 mg ekstrak ditimbang dan dilarutkan dengan pelarut DMSO 100  $\mu$ L untukekstrak etil asetat dan metanol. Untuk mendapatkan KHM digunakan beberapa variasi konsentrasi sampel. larutan stok diencerkan hingga mendapatkan konsentrasi larutan uji dengan konsentrasi yaitu 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,312, 0,156, 0,08, 0,04 dan 0,02 %.

#### b. Sampel fraksi

Setiap sampel fraksi ditimbang 2 mg dan dilarutkan pada DMSO sebanyak 1 mL, hingga didapatkan konsentrasi larutan stok 1000  $\mu$ g/mL. Larutan uji dibuat dengan mengencerkan larutan induk hingga mendapatkan konsentrasi larutan uji sebesar 1000, 500 dan 250  $\mu$ g/mL.

#### c. Sampel Isolat

Setiap sampel isolat ditimbang sebanyak 1 mg dilarutkan dalam 1 mL DMSO hingga mendapatkan konsentrasi uji 500  $\mu$ g/mL sebagai larutan induk. Larutan uji dibuat dengan mengencerkan larutan induk hingga mendapatkan konsentrasi larutan uji sebesar 100, 50, 25  $\mu$ g/mL.

### 3.5.7 Penentuan Konsentrasi Bunuh Minimum

Untuk mengetahui nilai KBM, setelah penentuan KHM. Alikuot dari 96 *well-microplate* yang tidak menunjukkan pertumbuhan bakteri digoreskan pada medium Blood agar untuk *P.acne* dan pada medium nutrisi agar untuk *S.aureus* dan *S.epidermidis*, kemudian diinkubasi pada kondisi aerob suhu 37°C selama 24 jam untuk *S.aureus*, dan *S.epidermidis*, sedangkan untuk *P.acne* diinkubasi pada kondisi anaerob pada suhu 37°C selama 72 jam. Konsentrasi paling rendah yang membunuh 99,9 % bakteri adalah nilai KBM.

### 3.6 Fraksinasi

Proses fraksinasi dilakukan pada ekstrak yang memiliki aktivitas antibakteri *P.acne* yang baik. Berdasarkan uji aktivitas antibakteri *P.acne* didapatkan bahwa n-heksan memiliki aktivitas antibakteri *P.acne* yang paling potensial, selanjutnya ekstrak etil asetat sehingga kedua ekstrak ini dilanjutkan ke proses fraksinasi menggunakan kromatografi kolom.

### 3.6.1 Fraksinasi Ekstrak N-Heksan

Sebanyak 20 g ekstrak kental n-heksan ditimbang dengan menggunakan cawan porselen. Ekstrak kental ditambahkan 20 g serbuk silika gel F254, dicampurkan hingga keduanya menyatu, selanjutnya didiamkan hingga ekstrak mengering dan menjadi bubuk serbuk. Fraksinasi dilakukan dengan menggunakan kolom kromatografi (d=5 cm, p= 100 cm) yang diisi dengan serbuk silica gel sebanyak 180 g hingga tingginya sekitar 40-50 cm. Serbuk silica gel dilarutkan terlebih dahulu menggunakan pelarut n-heksana 100% (teknis), dimasukkan perlahan ke dalam kolom, kran kolom dibuka hingga silika gel mengendap dan memadat. Saat proses pengisian, serbuk silika tidak boleh kering, untuk menghindari fase diam pecah (*crack*). Fraksinasi dilakukan secara gradien dengan meningkatkan polaritas pelarut, dimulai dengan menggunakan pelarut n-heksana 100%, kemudian dinaikkan dengan konsentrasi (n-heksana: etil asetat ~ 97,5:02,5, 95:5, 90:10 hingga mencapai 100% etil asetat, etil asetat: metanol ~ 90:10, 80:20 hingga mencapai 100% metanol). Hasil fraksinasi ditampung pada botol kaca 100 mL, pelarut diuapkan hingga mencapai 1/3 botol, dan dilakukan identifikasi kandungan dengan menggunakan KLT. Setiap botol yang memiliki profil hasil KLT yang sama disatukan.

### 3.6.2 Fraksinasi Ekstrak Etil Asetat

Sebanyak 20 g ekstrak kental etil asetat ditimbang dengan menggunakan cawan porselen. Ekstrak kental ditambahkan 20 g serbuk silika gel F254, dicampurkan hingga keduanya menyatu, selanjutnya didiamkan hingga ekstrak mengering dan menjadi bubuk serbuk. Fraksinasi dilakukan dengan menggunakan kolom kromatografi (d=5 cm, p= 100 cm) yang diisi dengan serbuk silica gel sebanyak 180 g hingga tingginya sekitar 40-50 cm. Serbuk silica gel dilarutkan terlebih dahulu menggunakan pelarut n-heksana: etil asetat (97,5:2,5) kemudian dimasukkan perlahan ke dalam kolom, kran kolom dibuka hingga silika gel mengendap dan memadat. Saat proses pengisian, serbuk silika tidak boleh kering, untuk menghindari fase diam pecah (*crack*). Fraksinasi dilakukan secara gradien dengan meningkatkan polaritas pelarut, dimulai dengan menggunakan pelarut n-heksana (100%), kemudian dinaikkan dengan konsentrasi pelarut hingga 100% metanol. Hasil fraksinasi ditampung pada botol kaca 100 mL, pelarut diuapkan hingga mencapai 1/3 botol, dan dilakukan identifikasi kandungan dengan menggunakan KLT. Setiap botol yang memiliki profil hasil KLT yang sama disatukan.

### 3.7 Isolasi dan Pemurnian

#### a. Pemurnian Fraksi G

Fraksi G dari ekstrak n-heksan dimurnikan kembali dengan menggunakan menggunakan kolom kecil berukuran panjang 40 cm dan diameter 2 cm, menggunakan fase diam silika gel 60 (0,063 - 0,200 mm) dan menggunakan fase gerak n-heksana : etil asetat (75:25). Serbuk silika dicampurkan dengan eluen dan dimasukkan perlahan ke dalam kolom, hingga ketinggian fase diam 20 cm. Sebanyak 1.420 mg fraksi G ditimbang, dicampurkan dengan silika gel hingga menjadi bubuk serbuk. Sampel dimasukkan perlahan kemudian dielusi. Laju aliran fase diatur 1 tetes/ detik. Fase gerak ditampung ke dalam vial, setiap vial di cek menggunakan KLT. Pada vial tampungan ke 67-78 memiliki karakter hasil KLT yang sama dan didapatkan kristal jarum setelah mengering. Pemurnian dilakukan dengan menarik senyawa yang larut dengan n-heksan dan etil asetat, sehingga didapatkan padatan kristal berbentuk jarum. Kristal jarum yang didapatkan kemudian diuji menggunakan Spektroskopi Massa, IR, dan NMR.

#### b. Pemurnian Fraksi L

Fraksi L dari ekstrak etil asetat dimurnikan kembali dengan menggunakan menggunakan kolom kecil berukuran panjang 40 cm dan diameter 2 cm, menggunakan fase diam silika gel 60 (0,063 - 0,200 mm) dan menggunakan fase gerak n-heksan (100). Serbuk silika dicampurkan dengan eluen dan dimasukkan perlahan ke dalam kolom, hingga ketinggian fase diam 20 cm. Sebanyak 1.580 mg fraksi L ditimbang, dicampurkan dengan silika gel hingga menjadi bubuk serbuk. Sampel dimasukkan perlahan ke dalam kolom kromatografi kemudian dielusi. Laju aliran fase diatur 1 tetes/ detik. Fase gerak ditampung ke dalam vial, setiap vial di cek menggunakan KLT. Pada botol vial tampungan ke 4 hingga 12 didapatkan profil KLT yang sama dengan 2 titik. Kemudian senyawa ini dimurnikan menggunakan metode KLT preparatif dengan fase diam plat silika gel 60 F 254 (Merck) dan fase gerak n-heksana : etil asetat (9:1). Lempeng silika kemudian dipotong pada titik tunggal, kemudian diekstraksi dengan pelarut etil asetat untuk menarik senyawa dari lempeng. Pelarut diuapkan hingga mendapatkan serbuk senyawa murni yang kemudian diuji menggunakan Spektroskopi Massa, IR dan NMR. Lalu pada vial 27-31 didapatkan serbuk putih setelah pelarut menguap. Serbuk tersebut dimurnikan dengan melarutkan zat yang terlarut dalam n-heksana dan etil asetat. Serbuk transparan dan serbuk putih yang didapatkan kemudian diuji menggunakan Spektroskopi

Massa, IR dan NMR.

### 3.8 Identifikasi Senyawa

Senyawa diidentifikasi dengan menganalisis data spektroskopi dari spektrofotometri IR, MS, spektroskopi *Nuclear Magnetic Resonance* proton ( $^1\text{H}$ -NMR) dan karbon ( $^{13}\text{C}$ -NMR), DEPT serta teknik NMR-2D yang meliputi HMQC dan HMBC.

#### 3.8.1 Pemeriksaan Spektrum Infra Merah (IR)

Isolat sejumlah 1 mg digerus dengan 100 mg KBr hingga homogen. Campuran dikempa dengan kekuatan 10 ton/cm<sup>3</sup> sehingga terbentuk sebuah pellet yang tipis, kemudian diukur serapan infra merahnya.

#### 3.8.2 Pemeriksaan *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR)

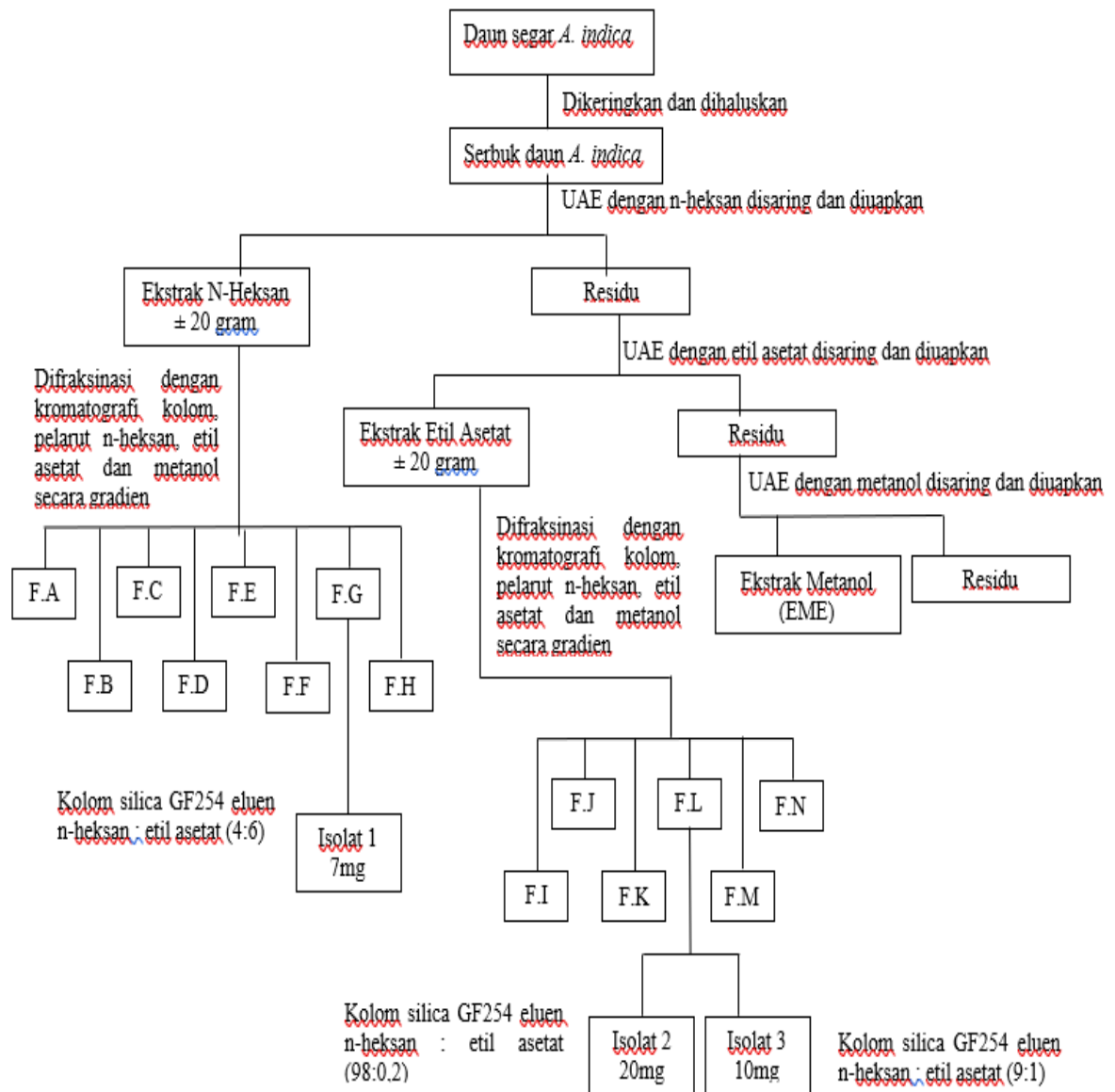
Isolat sebanyak 5 mg dilarutkan dalam CD<sub>3</sub>OD, dimasukkan ke dalam tabung kaca yang diletakkan di tengah tangki medan magnet yang berisi gas helium dan disekat dengan nitrogen cair. Dari hasil pengolahan data akan diperoleh spektrum resonansi magnetik inti proton ( $^1\text{H}$ -NMR), karbon ( $^{13}\text{C}$ -NMR), dan teknik 2D-NMR yang meliputi HMQC dan, HMBC.

#### 3.8.3 Pemeriksaan Spektrum Massa dengan GC-MS

Sebanyak 1 mg isolat murni dilarutkan dalam methanol. Diambil 10  $\mu\text{L}$  sampel dan disuntikkan pada GC-MS melalui kolom HP-5MS 30m x 250  $\mu\text{m}$  x 0,25  $\mu\text{m}$ , suhu oven 0°-325°C, kecepatan alir 104 mL/menit.

#### 3.8.4 Pemeriksaan Spektrum Massa dengan LC-MS

Sebanyak 1 mg isolat murni dilarutkan dalam methanol. Diambil 10  $\mu\text{L}$  sampel dan disuntikkan pada LC-MS melalui kolom Heliflex AT-5 ms, 30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$  kecepatan alir 0,5 mL/menit.



**Gambar 3.1** Bagan Hasil fraksinasi dan isolasi senyawa dari daun mimba

## BAB 4

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Ekstrak Daun Mimba

Berdasarkan penelusuran pustaka tersebut, efektifitas ekstrak daun mimba terhadap *P.acne* sampai saat ini masih belum banyak diketahui. Kurangnya penelitian terkait dengan efektifitas dari bagian-bagian tanaman mimba terhadap bakteri spesifik menyebabkan pengembangan tanaman mimba sebagai agen antibakteri menjadi kurang optimal. Beberapa literatur menyebutkan bagian tanaman obat yang berbeda memiliki aktivitas antimikroba yang berbeda pula (Vashist dan Anil, 2012). Dengan demikian, penelitian ini dilakukan untuk membandingkan efektifitas antibakteri ekstrak daun dari berbagai macam pelarut yang digunakan. Ekstrak daun mimba memiliki aktivitas antibakteri yang mengkonfirmasi kekuatan senyawa bioaktif dan membuktikan penggunaan tanaman mimba dalam pemeliharaan kesehatan (Herrera-Calderon *et al.*, 2019).

##### 4.1.1 Ekstraksi Daun Mimba

Dari hasil panen daun mimba kemudian dicuci dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Setelah itu dihaluskan dan disaring didapatkan simplisia kering. Hasil berat dan rendemen simplisia yang dihasilkan dapat dilihat pada Tabel 4.1.

**Tabel 4.1** Hasil Berat dan Rendemen Simplisia Daun Mimba

Simplisia	Berat basah (g)	Berat Simplisia kering (g)	Rendemen (%)
Daun Mimba	13.000	4.500	34,6

Ekstraksi daun mimba dilakukan dengan metode *ultrasonik assisted extraction* (UAE). Metode ini menggunakan bantuan gelombang ultrasonik (20-25.000 Hz) untuk memecah dinding sel tumbuhan sehingga pelarut akan lebih mudah terpenetrasi dan melarutkan senyawa metabolit di dalam sel tersebut. Berdasarkan penelitian Albayrak *et al.*, (2017) ekstraksi dengan menggunakan metode UAE lebih efektif dibandingkan dengan metode ekstraksi konvensional seperti maserasi atau soxhletasi. Metode UAE dapat mengekstraksi senyawa dengan waktu yang lebih cepat dengan menggunakan

jumlah pelarut yang lebih sedikit (Da Porto *et al.*, 2013). Proses ekstraksi dapat dilihat pada tabel 4.2.

**Tabel 4.2** Proses ekstraksi dengan UAE

Ekstraksi	Suhu	Waktu
UAE	40°C	30 Menit
Sokletasi	70-80 °C	30-150 Menit
Maserasi	Ruangan	3x24 jam

Proses ekstraksi dilakukan secara sekuensial menggunakan tiga jenis pelarut yaitu; n-heksana (non polar), etil asetat (semi polar), dan metanol (polar) yang dimulai dari polaritas pelarut yang terendah. Ketiga pelarut tersebut dipilih untuk memaksimalkan senyawa metabolit yang dapat diekstraksi. Polaritas pelarut akan mempengaruhi jenis dan jumlah senyawa yang dapat diekstraksi (Wojcikowski *et al.*, 2007). Proses ekstraksi dilakukan selama 30 menit dengan proses pemanasan pada suhu 40°C. Ekstraksi diulang sebanyak tiga kali dengan menggunakan pelarut yang selalu baru agar pelarut tidak jenuh dan hasil ekstraksi yang didapat lebih banyak. Hasil berat dan rendemen ekstrak yang dihasilkan pada proses ekstraksi daun mimba ditunjukkan pada Tabel 4.3.

**Tabel 4.3** Hasil berat dan rendemen ekstrak daun mimba

Jenis Ekstrak	ENH	EEA	EME
Berat Ekstrak (g)	7,4	7	4,1
Rendemen Ekstrak (%)	3,7	3,5	2,05

Keterangan: ekstrak n-heksan (ENH), ekstrak etil asetat (EEA) dan ekstrak metanol (EME) daun mimba

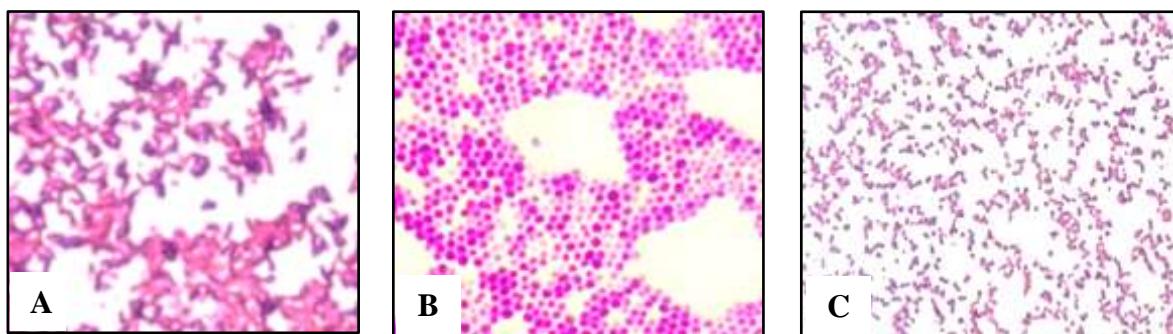
Pada hasil rendemen ekstrak yang di dapatkan dari daun mimba, ekstrak NH memiliki hasil rendemen tertinggi dibandingkan dengan ekstrak EA dan ME. Kandungan non polar didalam daun mimba banyak larut dalam proeses ekstraksi yang menggunakan pelarut N-heksan. Ekstraksi UAE daun mimba menghasilkan ekstrak N-heksan sebesar 3,7 %, ekstrak etil asetat sebesar 3,5 % dan ekstrak metanol sebesar 2,05 %. Berdasarkan literatur, daun mimba mengandung minyak sebesar 0,88%-9,53 %. Kandungan minyak daun mimba dapat berbeda-beda tergantung lokasi tumbuh (Susila, 2017). Selain itu, perbedaan metode ekstraksi yang digunakan juga dapat menyebabkan perbedaan kadar

minyak yang dihasilkan. Sonikasi merupakan metode yang paling efektif dalam ekstraksi bahan alam. Sonikasi menghasilkan rendemen tinggi, waktu ekstraksi cepat dan selektifitas yang cukup baik. Selain itu, metode ekstraksi sonikasi sangat efektif untuk mengekstraksi senyawa-senyawa termolabil karena dapat mengurangi paparan suhu tinggi (Azwanida, 2015).

## 4.2 Penapisan Gram

Uji identifikasi menggunakan pewarnaan Gram dilakukan berdasarkan teori perbedaan komposisi penyusun dinding sel antara bakteri Gram positif dan Gram negatif. Bakteri Gram positif memiliki dinding sel dengan peptidoglikan yang tebal dengan asam tekoik, yang memungkinkan bakteri mengikat pewarna violet selama pewarnaan Gram sedangkan bakteri Gram negatif memiliki dinding sel dengan komposisi peptidoglikan yang tipis tanpa asam tekoik, yang memungkinkan dinding sel untuk berwarna merah muda selama pewarnaan Gram (Soedarto, 2015).

Bakteri yang mampu mempertahankan pewarnaan kristal violet selama pewarnaan Gram, memberikan warna positif disebut Gram positif. Bakteri ini akan menunjukkan warna ungu di bawah mikroskop. Lapisan peptidoglikan tebal pada bakteri Gram positif bertanggung jawab dalam mempertahankan warna kristal violet bahkan setelah dekolisasi dengan alkohol. Bakteri *P. acnes*, *S. aureus* dan *S. epidermidis* memberikan hasil positif pada uji pewarnaan Gram sehingga disebut bakteri Gram positif (Soedarto, 2015). Bakteri *P. acnes* memiliki bentuk morfologi berupa batang tidak beraturan, *S. aureus* berbentuk bulat tersusun bergerombol seperti anggur, sedangkan *S. epidermidis* berbentuk bulat yang tidak beraturan. Gambar bakteri menggunakan mikroskop dengan perbesaran 100 kali seperti pada Gambar 4.1.



**Gambar 4.1** Hasil Pewarnaan Gram pada perbesaran 100x (A) Bakteri *P. acne* (B), Bakteri *S. epidermidis*, (C) Bakteri *S. aureus*

### 4.3 Pengujian Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Mimba

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan menggunakan metode KHM dan KBM.

#### 4.3.1 Pengujian nilai KHM ekstrak daun mimba

Uji nilai KHM dilakukan untuk mengetahui konsentrasi terkecil antimikroba yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *P.acne* dengan agen antimikroba yaitu ekstrak n-heksan, ekstrak etil asetat dan ekstrak metanol. Uji KHM dilakukan dengan menggunakan metode mikrodilusi cair dengan pengenceran dua kali menggunakan 96-well microplate, selanjutnya evaluasi nilai KHM dalam penelitian ini dilakukan secara visual. Dapat dilihat pada Tabel 4.4.

**Tabel 4.4** Hasil uji KHM pada bakteri *P.acne* (Eksperimen ke 1 dan 2)

		Pengamatan Visual									
		Konsentrasi (%)									
Ekstrak		0.02	0.04	0.08	0.156	0.31	0.625	1.25	2.5	5	10
	NH	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	EA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	ME	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
		Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )									
Klindamisin		0,0001	0,0002	0,0005	0,001	0,002	0,004	0,008	0,015	0,03	0,06
		+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

Keterangan : + keruh/ ada pertumbuhan; - jernih/ tidak ada pertumbuhan, NH adalah n-heksan, EA adalah etil asetat, ME adalah metanol. Pada hasil ini dilakukan dengan dua independen eksperimen yang masing-masing dilakukan duplo

#### 4.3.2 Pengujian nilai KBM Ekstrak Daun Mimba

Selain studi KHM, dilakukan juga uji kadar bunuh minimum (KBM) untuk mengevaluasi aktivitas pembunuhan bakteri antara masing-masing ekstrak. Studi KBM pada ekstrak didapatkan dengan cara menggoreskan alikuot daru uji KHM yang tidak menunjukkan pertumbuhan bakteri (jernih). Dapat dilihat pada Tabel 4.5 dan 4.6.

**Tabel 4.5** Hasil Uji Aktivitas KBM (Eksperimen ke 1)

Ekstrak	Konsentrasi (%)		
	2,5	5	10
N-Heksan	+	-	-
Etil Asetat	+	+	-
Metanol	+	+	-
Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Klindamisin		
0,015	+		
0,03	+		
0,06	+		

Keterangan : + keruh/ ada pertumbuhan; - jernih/ tidak ada pertumbuhan

**Tabel 4.6** Hasil Uji Aktivitas KBM (Eksperimen ke 2)

Ekstrak	Konsentrasi (%)		
	2,5	5	10
N-Heksan	+	-	-
Etil Asetat	+	+	-
Metanol	+	+	+
Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Klindamisin		
0,015	+		
0,03	+		
0,06	+		

Keterangan : + keruh/ ada pertumbuhan; - jernih/ tidak ada pertumbuhan

Pengujian pada ekstrak NH, EA dan ME dibuat dengan melarutkan ekstrak dalam dimetil sulfoksida (DMSO) yang digunakan sebagai pelarut dikarenakan DMSO mampu melarutkan ekstrak dengan sempurna. Selain itu DMSO juga tidak mempunyai daya antibakteri terhadap bakteri uji yang digunakan, sehingga tidak mempengaruhi hasil uji antibakteri (Kustyaningsih, 2004). Hasil uji KHM pada ekstrak NH, EA dan ME yang dapat dilihat pada Tabel 4.2 menunjukkan tidak ada pertumbuhan bakteri *P.acne* pada konsentrasi 5 dan 10 % untuk ekstrak NH, sedangkan pada ekstrak EA dan ME tidak ada pertumbuhan bakteri *P.acne* pada konsentrasi 10%. Kemudian dipastikan kembali dengan uji KBM dan menunjukkan bahwa pada ekstrak NH dalam konsentrasi lebih rendah

dapat menghambat pertumbuhan bakteri *P.acne* dibanding ekstrak EA dan ME seperti dapat dilihat pada Tabel 4.3 dan 4.4.

Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak n-heksan memiliki aktivitas yang lebih baik dibandingkan ekstrak etil asetat dan metanol. Beberapa senyawa kimia dalam ekstrak n-heksan diduga dapat menyebabkan aktivitas kerja gabungan dari beberapa senyawa antibakteri sehingga lebih efektif dibandingkan dengan aktivitas kerja dari masing-masing senyawa (Jawetz *et. al.*, 2005). Kemampuan suatu zat antibakteri dalam menghambat ataupun membunuh bakteri tergantung pada konsentrasi zat antibakteri (Schlegel dan Schmidt, 1994). Semakin besar konsentrasi zat antibakteri maka semakin besar juga daerah hambat pertumbuhan bakteri.

KHM pada klindamisin masih menunjukkan pertumbuhan bakteri *P.acne* hal ini dikarenakan pada konsentrasi tersebut klindamisin masih bersifat bakteriostatik (Crane *et al.*, 2013). Klindamisin adalah antibiotik semisintetik yang memiliki mekanisme aksi dengan menghambat sintesis protein dengan mengikat subunit 50S ribosom bakteri sehingga perkembangan biakan bakteri berhenti (Cameli *et. al.* 2018). Berdasarkan penelitian efek bakterisidal pada MIC<sub>90</sub> range konsentrasi klindamisin 0.13-2 (Linuma *et. al.*, 2011). Selain menghambat pada tingkat ribosom pada konsentrasi ini klindamisin akan berkerja membunuh pertumbuhan bakteri, sehingga menyebabkan kematian sel bakteri.

Adanya infeksi bakteri pada kulit merupakan salah satu faktor terjadinya peradangan kelenjar sebacea yang mengakibatkan munculnya jerawat. Aktivitas anti *P.acne* dari daun mimba ekstrak nheksan dan etil asetat yang diamati pada penelitian ini, mengindikasikan terkandungnya senyawa aktif yang berpotensi menghambat pertumbuhan *P.acne*. Sehingga pada tahap selanjut akan dilakukan proses fraksinasi dan isolasi senyawa aktif.

#### **4.4 Fraksinasi Ekstrak Daun Mimba**

Proses fraksinasi dilakukan pada ekstrak N-Heksan daun mimba yang memiliki aktivitas antibakteri *P.acne* yang baik. Proses fraksinasi menghasilkan 170 tumpukan botol yang kemudian dianalisis menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT). Botol dengan hasil KLT yang sama dikelompokkan hingga mendapatkan 8 fraksi (A-H). Setiap fraksi diuji aktivitas antibakteri *P.acne* dengan metode KHM dan KBM. Hasil fraksinasi dari ekstrak N-Heksan daun mimba ditunjukkan pada Tabel 4.7.

**Tabel 4.7** Hasil Fraksinasi Ekstrak N-Heksan Daun Mimba

Fraksi	Botol	Berat (g)	% Berat Fraksi
A	1-27	1,62	8,10
B	28-49	2,15	10,75
C	50-60	0,75	3,75
D	61-75	1,46	7,30
E	76-99	2,65	13,25
F	100-122	1,04	5,20
G	123-143	1,42	7,10
H	144-170	1,37	6,85

Keterangan : % berat fraksi didapatkan dari berat fraksi yang dihasilkan dibagi dengan jumlah total ekstrak yang difraksinasi (20 g)

#### 4.4.1 Pengujian nilai KHM fraksi ekstrak N-heksan

Uji nilai KHM dilakukan untuk mengetahui konsentrasi terkecil antimikroba yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *P.acne* dengan agen antimikroba yaitu fraksi ekstrak N-heksan. Uji KHM dilakukan dengan menggunakan metode mikrodilusi cair dengan pengenceran dua kali menggunakan *96-well microplate*, selanjutnya evaluasi nilai KHM dalam penelitian ini dilakukan secara visual. Dapat dilihat pada Tabel 4.8.

**Tabel 4.8** Hasil Uji KHM Pada Bakteri *P.acne* (Eksperimen ke 1 dan 2)

Ekstrak NH	Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	250	500	1000
Fraksi A	+	-	-
Fraksi B	+	+	-
Fraksi C	+	-	-
Fraksi D	+	-	-
Fraksi E	+	+	-
Fraksi F	+	+	-
Fraksi G	+	-	-
Fraksi H	+	+	-
Antibiotik	Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	0,6	1,2	
Klindamisin	-	-	

Keterangan : + keruh/ ada pertumbuhan; - jernih/ tidak ada pertumbuhan

#### 4.4.1 Pengujian nilai KBM Fraksi Ekstrak N-heksan

Selain studi KHM, dilakukan juga uji kadar bunuh minimum (KBM) untuk mengevaluasi aktivitas pembunuhan bakteri antara masing-masing ekstrak. Studi KBM

pada ekstrak didapatkan dengan cara menggoreskan alikuot dari uji KHM yang tidak menunjukkan pertumbuhan bakteri (jernih). Dapat dilihat pada Tabel 4.9 dan 4.10.

**Tabel 4.9** Hasil Uji KBM Fraksi Ekstrak N-Heksan Daun Mimba (Eksperimen ke 1)

Ekstrak NH	Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	250	500	1000
Fraksi A	+	-	-
Fraksi B	+	+	-
Fraksi C	+	-	-
Fraksi D	+	-	-
Fraksi E	+	+	-
Fraksi F	+	+	-
Fraksi G	+	-	-
Fraksi H	+	+	-
Antibiotik	Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	0,6	1,2	
Klindamisin	-	-	

Keterangan : + keruh/ ada pertumbuhan; - jernih/ tidak ada pertumbuhan

**Tabel 4.10** Hasil Uji KBM Fraksi Ekstrak N-Heksan Daun Mimba (Eksperimen ke 2)

Ekstrak NH	Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	250	500	1000
Fraksi A	+	-	-
Fraksi B	+	+	-
Fraksi C	+	-	-
Fraksi D	+	-	-
Fraksi E	+	+	-
Fraksi F	+	+	-
Fraksi G	+	-	-
Fraksi H	+	+	-
Antibiotik	Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	0,6	1,2	
Klindamisin	-	-	

Keterangan : + keruh/ ada pertumbuhan; - jernih/ tidak ada pertumbuhan

Berdasarkan hasil pengujian aktivitas antibakteri *P.acne* pada fraksi ekstrak n-heksan, terdapat beberapa 3 fraksi yang memiliki potensi aktivitas KHM dan KBM yaitu fraksi A, B dan G. Namun pada fraksi G memiliki potensi tinggi dengan adanya pertumbuhan bakteri *P.acne* yang lebih sedikit dibandingkan dengan fraksi A dan B pada 250 ppm.

Ekstrak etil asetat daun mimba difraksinasi menggunakan metode kromatografi kolom menghasilkan 150 tampungan botol yang diidentifikasi menggunakan KLT. Botol dengan hasil KLT yang sama digabung menjadi satu, menghasilkan 6 fraksi (I-N). Setiap fraksi diuji aktivitas antibakteri *P.acne* dengan metode KHM dan KBM. Hasil fraksinasi ditunjukkan pada Tabel 4.11.

**Tabel 4.11** Hasil Fraksinasi Fraksi Ekstrak Etil Asetat Daun Mimba

Fraksi	Botol	Berat (g)	% Berat Fraksi
I	1-25	2,26	11,3
J	26-44	1,00	5,00
K	45-64	1,78	8,90
L	65-88	1,58	7,90
M	89-118	0,93	4,65
N	119-150	2,17	10,85

Keterangan : % berat fraksi didapatkan dari berat fraksi yang dihasilkan dibagi dengan jumlah total ekstrak yang difraksinasi (20 g)

#### 4.4.2 Pengujian nilai KHM fraksi ekstrak Etil Asetat

Uji nilai KHM dilakukan untuk mengetahui konsentrasi terkecil antimikroba yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *P.acne* dengan agen antimikroba yaitu fraksi ekstrak Etil asetat. Uji KHM dilakukan dengan menggunakan metode mikrodilusi cair dengan pengenceran dua kali menggunakan *96-well microplate*, selanjutnya evaluasi nilai KHM dalam penelitian ini dilakukan secara visual. Dapat dilihat pada Tabel 4.12 dan 4.13.

**Tabel 4.12** Hasil uji KHM pada bakteri *P.acne* (Eksperimen ke 1)

Ekstrak EA	Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	250	500	1000
Fraksi I	+	-	-
Fraksi J	+	-	-
Fraksi K	+	-	-
Fraksi L	-	-	-
Fraksi M	+	-	-
Fraksi N	+	-	-
Antibiotik	Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	0,6	1,2	
Klindamisin	-	-	

Keterangan : + keruh/ ada pertumbuhan; - jernih/ tidak ada pertumbuhan

**Tabel 4.13** Hasil uji KHM pada bakteri *P.acne* (Eksperimen ke 2)

Ekstrak EA	Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	250	500	1000
Fraksi I	+	-	-
Fraksi J	+	-	-
Fraksi K	-	-	-
Fraksi L	-	-	-
Fraksi M	+	-	-
Fraksi N	-	-	-
Antibiotik	Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	0,6	1,2	
Klindamisin	-	-	

Keterangan : + keruh/ ada pertumbuhan; - jernih/ tidak ada pertumbuhan

#### 4.4.3 Pengujian nilai KBM Fraksi Ekstrak Etil Asetat

Selain studi KHM, dilakukan juga uji kadar bunuh minimum (KBM) untuk mengevaluasi aktivitas pembunuhan bakteri antara masing-masing ekstrak. Studi KBM pada ekstrak didapatkan dengan cara menggoreskan alikuot dari uji KHM yang tidak menunjukkan pertumbuhan bakteri (jernih) terlihat pada Tabel 4.14 dan 4.15.

**Tabel 4.14** Hasil Uji KBM pada *P.acne* (Eksperimen Ke 1)

Ekstrak EA	Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	250	500	1000
Fraksi I	+	-	-
Fraksi J	+	-	-
Fraksi K	-	-	-
Fraksi L	-	-	-
Fraksi M	+	-	-
Fraksi N	-	-	-
Antibiotik	Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	0,6	1,2	
Klindamisin	-	-	

Keterangan : + keruh/ ada pertumbuhan; - jernih/ tidak ada pertumbuhan

**Tabel 4.15** Hasil Uji KBM pada *P.acne* (Eksperimen Ke 2)

Ekstrak EA	Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	250	500	1000
Fraksi I	+	-	-
Fraksi J	+	-	-
Fraksi K	+	-	-
Fraksi L	-	-	-
Fraksi M	+	-	-
Fraksi N	+	-	-
Antibiotik	Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	0,6	1,2	
Klindamisin	-	-	

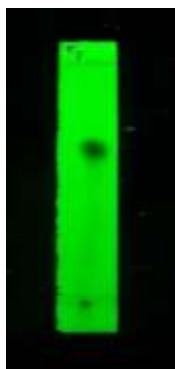
Keterangan : + keruh/ ada pertumbuhan; - jernih/ tidak ada pertumbuhan

Hasil pengujian aktivitas antibakteri *P.acne* pada fraksi dari ekstrak etil asetat menunjukkan terdapat 3 fraksi yang memiliki potensi aktivitas KHM dan KBM yaitu fraksi K, L dan N. Namun pada fraksi L memiliki potensi tinggi dengan tidak adanya pertumbuhan bakteri *P.acne* sejak konsentrasi 250 ppm dibandingkan dengan fraksi K dan L pada 250 ppm masih menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri *P.acne*.

## 4.5 Isolasi dan Pemurnian Senyawa

### 4.5.1 KLT Senyawa Isolat 1

Senyawa isolat 1 yang berhasil dimurnikan dari fraksi G ekstrak n-heksan sebanyak 7 mg berbentuk serbuk kristal jarum berwarna putih. Hasil identifikasi dengan menggunakan KLT fase diam silika gel F254 (4 cm x 6 cm) dan fase gerak n-heksana: etil asetat dengan perbandingan 4 : 6. Dengan nilai  $R_f$  0,65. Hasil KLT senyawa isolat 1 ditunjukkan pada Gambar 4.2.

**Gambar 4.2** Hasil KLT senyawa isolat 1 di bawah lampu UV 254

#### 4.5.2 KLT Senyawa Isolat 2

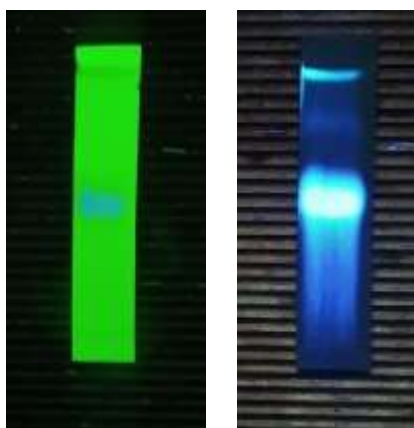
Senyawa isolat 2 yang berhasil dimurnikan dari fraksi N ekstrak etil asetat sebanyak 10 mg berbentuk serbuk kristal jarum berwarna putih. Hasil identifikasi dengan menggunakan KLT fase diam silika gel F254 (4 cm x 6 cm) dan fase gerak n-heksana: etil asetat dengan perbandingan 98 : 0,2. Dengan nilai Rf Hasil KLT senyawa isolat 2 ditunjukkan pada Gambar 4.3.



**Gambar 4.3** Hasil KLT senyawa isolat 2 di bawah lampu UV 356 nm

#### 4.5.3 KLT Senyawa Isolat 3

Senyawa isolat 3 yang berhasil dimurnikan dari fraksi N ekstrak etil asetat sebanyak 10 mg berbentuk serbuk transparan. Hasil identifikasi dengan menggunakan KLT fase diam silika gel F254 (4 cm x 6 cm) dan fase gerak n-heksana: etil asetat dengan perbandingan 9 : 1. Dengan nilai Rf 0,8. Hasil KLT senyawa isolat 3 ditunjukkan pada Gambar 4.4.



**Gambar 4.4** Hasil KLT senyawa isolat 3 di bawah lampu 254 dan 356 nm

## 4.6 Uji Aktivitas Isolat

### 4.6.1 Pengujian nilai KHM Isolat pada *P.acne*

Uji KHM dilakukan dengan menggunakan metode mikrodilusi cair dengan pengenceran dua kali menggunakan *96-well microplate*, selanjutnya evaluasi nilai KHM dalam penelitian ini dilakukan secara visual. Dapat dilihat pada Tabel 4.16.

**Tabel 4.16** Hasil Uji KHM Isolat bakteri *P.acne* (eksperimen ke-1 dan 2)

Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Senyawa Isolat		
	Isolat 1	Isolat 2	Isolat 3
100	-	-	-
50	-	+	+
25	+	+	+
Antibiotik	Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	0,6	1,2	
Klindamisin	-	-	

Keterangan : + keruh/ ada pertumbuhan; - jernih/ tidak ada pertumbuhan

### 4.6.2 Pengujian nilai KBM Isolat pada *P.acne*

Selain studi KHM, dilakukan juga uji kadar bunuh minimum (KBM) untuk mengevaluasi aktivitas pembunuhan bakteri antara masing-masing ekstrak. Studi KBM pada ekstrak didapatkan dengan cara menggoreskan alikuot dari uji KHM yang tidak menunjukkan pertumbuhan bakteri (jernih) terlihat pada Tabel 4.17.

**Tabel 4.17** Hasil Uji KBM Isolat pada *P.acne* (Eksperimen ke-1 dan 2)

Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Senyawa Isolat		
	Isolat 1	Isolat 2	Isolat 3
100	-	-	-
50	-	+	+
25	+	+	+
Antibiotik	Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	0,6	1,2	
Klindamisin	-	-	

Keterangan : + keruh/ ada pertumbuhan; - jernih/ tidak ada pertumbuhan

Hasil pengujian aktivitas antibakteri *P.acne* dengan nilai KHM dan KBM pada isolat menunjukkan bahwa isolat 1 memiliki potensi aktivitas teraktif pada 50 ppm, dibandingkan dengan isolat 2 dan 3. Lalu pada isolat 2 dan 3 aktif menghambat *P.acne* pada 100ppm.

#### 4.6.3 Pengujian nilai KHM Isolat pada *S.aureus*

Uji KHM dilakukan dengan menggunakan metode mikrodilusi cair dengan pengenceran dua kali menggunakan *96-well microplate*, selanjutnya evaluasi nilai KHM dalam penelitian ini dilakukan secara visual. Dapat dilihat pada Tabel 4.18.

**Tabel 4.18** Hasil Uji KHM Isolat bakteri *S.aureus* (eksperimen ke-1 dan 2)

Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Senyawa Isolat		
	Isolat 1	Isolat 2	Isolat 3
100	-	+	-
50	-	+	+
25	+	+	+
Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Antibiotik Klindamisin		
1	+		
2	+		
4	+		
8	+		
16	-		
32	-		
64	-		
128	-		

Keterangan : + keruh/ ada pertumbuhan; - jernih/ tidak ada pertumbuhan

#### 4.6.4 Pengujian nilai KBM Isolat pada *S.aureus*

Selain studi KHM, dilakukan juga uji kadar bunuh minimum (KBM) untuk mengevaluasi aktivitas pembunuhan bakteri antara masing-masing ekstrak. Studi KBM pada ekstrak didapatkan dengan cara menggoreskan alikuot dari uji KHM yang tidak menunjukkan pertumbuhan bakteri (jernih) terlihat pada Tabel 4.19.

**Tabel 4.19** Hasil Uji KBM Isolat pada *S.aureus* (Eksperimen ke-1 dan 2)

Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Senyawa Isolat		
	Isolat 1	Isolat 2	Isolat 3
100	-	+	-
50	-	+	+
25	+	+	+
Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Antibiotik Klindamisin		
1	+		
2	+		
4	+		
8	+		

16	-
32	-
64	-
128	-

Keterangan : + keruh/ ada pertumbuhan; - jernih/ tidak ada pertumbuhan

Hasil pengujian aktivitas antibakteri *S.aureus* dengan nilai KHM dan KBM ada perbedaan antara eksperimen 1 dan 2 pada isolat 2 dan 3. Nilai KHM dan KBM menunjukkan bahwa isolat 1 memiliki potensi aktivitas teraktif pada 50 ppm, dibandingkan dengan isolat 2 dan 3. Lalu pada isolat 3 aktif menghambat *S.aureus* pada 50 ppm, sedangkan isolat 2 menghambat *S.aureus* pada 100 ppm yang terlihat pada Tabel 4.17 hasil uji eksperimen ke 2. Untuk Klindamisin terhadap bakteri *S.aureus* terlihat jernih/ tidak tumbuh bakteri pada konsentrasi 16 ppm.

#### 4.6.5 Pengujian nilai KHM Isolat pada *S.epidermidis*

Uji KHM dilakukan dengan menggunakan metode mikrodilusi cair dengan pengenceran dua kali menggunakan *96-well microplate*, selanjutnya evaluasi nilai KHM dalam penelitian ini dilakukan secara visual. Dapat dilihat pada Tabel 4.20.

**Tabel 4.20** Hasil Uji KHM Isolat bakteri *S.epidermidis* (eksperimen ke-1 dan 2)

Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Senyawa Isolat		
	Isolat 1	Isolat 2	Isolat 3
100	-	-	-
50	+	+	+
25	+	+	+
Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Antibiotik Klindamisin		
1	+		
2	+		
4	+		
8	+		
16	-		
32	-		
64	-		
128	-		

Keterangan : + keruh/ ada pertumbuhan; - jernih/ tidak ada pertumbuhan

#### 4.6.6 Pengujian nilai KBM Isolat pada *S.epidermidis*

Selain studi KHM, dilakukan juga uji kadar bunuh minimum (KBM) untuk mengevaluasi aktivitas pembunuhan bakteri antara masing-masing ekstrak. Studi KBM pada ekstrak didapatkan dengan cara menggoreskan alikuot dari uji KHM yang tidak menunjukkan pertumbuhan bakteri (jernih) terlihat pada Tabel 4.21.

**Tabel 4.21** Hasil Uji KBM Isolat pada *S.epidermidis* (Eksperimen ke-1 dan 2)

Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Senyawa Isolat		
	Isolat 1	Isolat 2	Isolat 3
100	-	+	-
50	-	+	+
25	+	+	+
Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Antibiotik Klindamisin		
1	+		
2	+		
4	+		
8	+		
16	-		
32	-		
64	-		
128	-		

Keterangan : + keruh/ ada pertumbuhan; - jernih/ tidak ada pertumbuhan

Hasil pengujian aktivitas antibakteri *S.epidermidis* dengan nilai KHM semua isolat 1, 2 dan 3 terlihat jernih tidak adanya pertumbuhan bakteri pada 100 ppm. Sedangkan pada hasil KBM terlihat kekeruhan yang menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri *S.epidermidis*. Hal ini dikarenakan pada konsentrasi tersebut belum dapat membunuh bakteri secara optimum dan diduga hanya menghambat pertumbuhan. Untuk Klindamisin terhadap bakteri *S.epidermidis* pada hasil KHM terlihat jernih/ tidak tumbuh bakteri pada konsentrasi 16 ppm. Sedangkan pada hasil KBM terdapat pertumbuhan bakteri. Sehingga konsentrasi optimum klindamisin untuk membunuh bakteri *S.epidermidis* pada 32 ppm.

Hasil pengujian dari bakteri *P.acne*, *S.epidermidis* dan *S.aureus* disimpulkan bahwa aktivitas antibakteri terjadi adanya perbedaan aktivitas antibakteri karena adanya perbedaan komponen penyusun dinding sel antara bakteri gram positif dan negatif. Menurut Pelczar dkk. (1986), dinding sel bakteri gram positif relatif lebih sederhana, sehingga senyawa antibakteri lebih mudah masuk ke dalam sel dan menemukan sasaran

untuk merusak struktur dinding sel. Sedangkan struktur dinding sel bakteri gram negatif lebih kompleks yang terdiri dari 3 lapisan, yaitu lapisan luar yang berupa peptidoglikan. Lapisan luar yang terdapat zat-zat yang bersifat racun termasuk zat antibakteri yang dapat menghambat sintesis peptidoglikan. Hal ini menyebabkan bakteri gram negatif lebih resisten terhadap zat antibakteri dibandingkan bakteri gram positif. Selain hal tersebut perbedaan aktivitas antibakteri suatu zat antibakteri tergantung pada tipe ekstrak, spesies tanaman dan spesies bakteri itu sendiri (Durmas dkk, 2006). Dapat dilakukan elucidasi struktur dengan isolat teraktif yaitu isolat 1 yang didapat dari ekstrak n-heksan dan isolat 3 yang didapat dari ekstrak etil asetat.

#### **4.7 Penentuan Struktur Molekul**

Penentuan struktur senyawa 1 adalah isolat dari ekstrak n-heksan dan isolat 3 adalah isolate dari ekstrak etil asetat. Kemudian dilakukan dengan menggunakan spektrofotometri infra merah (IR), spektrometri massa, serta resonansi magnetik inti proton ( $^1\text{H-NMR}$ ), Resonansi magnetic inti karbon ( $^{13}\text{C-NMR}$ ), HMBC dan HMQC.

##### **4.7.1 Data Hasil Pengukuran Spektrofotometri IR Senyawa 1**

Pada spektrum IR (Lampiran 20) menunjukkan adanya puncak pada bilangan gelombang 3423 menunjukkan adanya gugus (OH), 2956 menunjukkan adanya gugus (CH), 1028 menunjukkan adanya gugus (CO), 1452 dan 1373 menunjukkan adanya ikatan (C=C) pada gugus alkena.

##### **4.7.2 Data Hasil Pengukuran GCMS Senyawa Isolat 1**

Senyawa Isolat 1 (Lampiran 21 ) mempunyai berat molekul (BM) 430, dengan adanya puncak ion (M+H) 431 dan rumus molekul  $\text{C}_{28}\text{H}_{46}\text{O}_3$ .

##### **4.7.3 Data Hasil Pengukuran NMR Senyawa Isolat 1**

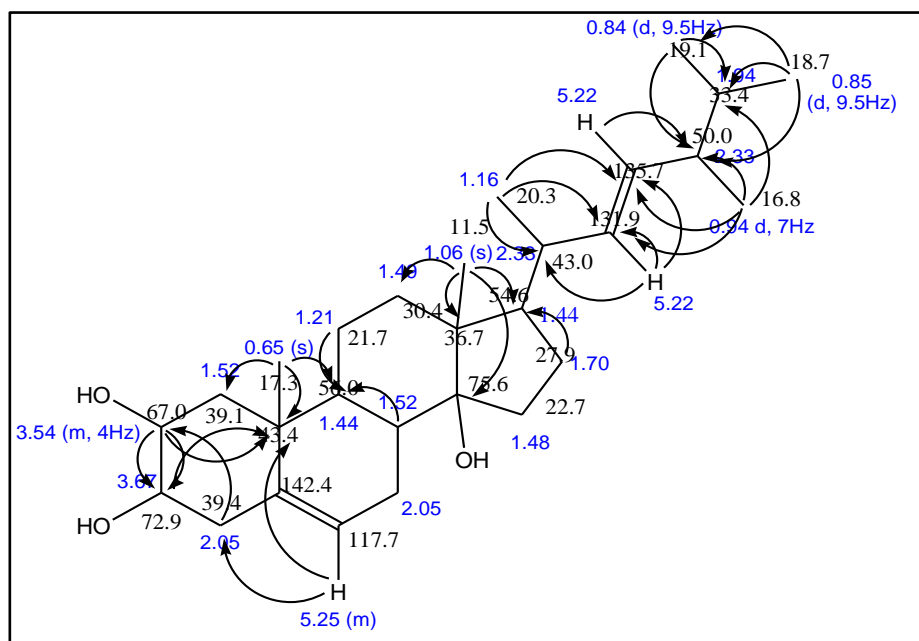
Pada hasil spektrum H-NMR (Lampiran 22) menunjukkan adanya enam sinyal metil yang beresonansi pada 0.65 (s) dan 1.06 (s), 0.94 (d, 7 Hz), 0.85 (d, 9.5Hz), 0.83 (d, 9.5 Hz) dan 1.04 ppm (d, 7 Hz) dengan ada nilai J yang didapat menyatakan bahwa adanya konektivitas ikatan kimia yang tidak dipengaruhi oleh medan magnet.

Pada spektrum C-NMR (Lampiran 23) diperjelas dengan percobaan DEPT  $135^\circ$  menunjukkan adanya 28 sinyal karbon yang berupa signal metil yang beresonansi pada  $\delta_c$  11,4; 16,8; 17,6; 18,7; 19,1 dan 20,3 ppm. Adanya signal metilen pada  $\delta_c$  21,7; 22,7; 27,8; 30,4; 32,6; 39,1 dan 39,3 ppm. Adanya signal metin pada  $\delta_c$  33,4; 40,5; 43,0; 43,4;

50.0; 54,6; 56.0; 67.0; 72,9; 117,7; 131,9 dan 135,7 ppm. Adanya Sisa atom karbon yang tidak muncul pada spektrum DEPT 135 merupakan atom karbon kuarterner pada  $\delta_C$  75,6 dan 142,4 ppm.

Hasil analisis HMQC (Lampiran 24) menunjukkan hubungan antara proton dan karbon dalam satu ikatan. Spektrum HMQC menunjukkan adanya ikatan antara atom H-2 ( $\delta_H$  3,54 ppm, s) dan C-3 ( $\delta_C$  72,9 ppm), atom H-8 ( $\delta_H$  1,52 ppm, s) dan C-9 ( $\delta_C$  54,6 ppm), atom H-18 ( $\delta_H$  0,65 ppm, s) C-10 ( $\delta_C$  43,4 ppm) dan C-18 ( $\delta_C$  17,3 ppm), atom H-19 ( $\delta_H$  1,06 ppm, s) dan C-19 ( $\delta_C$  11,5 ppm), atom H-22 ( $\delta_H$  5,22 ppm, s) dan C-22 ( $\delta_C$  135,7 ppm), atom H-27 ( $\delta_H$  0,85 ppm, s) dan C-25 ( $\delta_C$  35,4 ppm), serta atom H-28 ( $\delta_H$  0,84 ppm, s) dan C-25 ( $\delta_C$  35,4 ppm),.

Berdasarkan analisis HMBC (Lampiran 25) menunjukkan korelasi antara proton dan atom karbon yang berjarak dua hingga tiga ikatan. Terdapat beberapa korelasi yang ditunjukkan pada spektrum HMBC. Atom H-27 ( $\delta_H$  0,85 ppm, d  $J= 9,5$  Hz) memiliki korelasi dengan atom C-24 ( $\delta_C$  43,4 ppm), atom H-18 ( $\delta_H$  0,65 ppm, s) memiliki korelasi dengan atom C-1, C-9 ( $\delta_C$  39,1 dan 56,0 ppm), atom H-28 ( $\delta_H$  0,84 ppm, d  $J= 9,5$ Hz) memiliki korelasi dengan atom C-24 ( $\delta_C$  43,4 ppm), atom H-21 ( $\delta_H$  1,04 ppm, d  $J= 7$ Hz) memiliki korelasi dengan atom C-14, C-22, C-23 ( $\delta_C$  75,6; 131,9 dan 135,7 ppm), atom H-6 ( $\delta_H$  5,25 ppm) memiliki korelasi dengan atom C-4, C-10 ( $\delta_C$  39,4 dan 40,5 ppm), atom H-22 ( $\delta_H$  5,22 ppm) memiliki korelasi dengan atom C-20, C-23 ( $\delta_C$  43,0 dan 135,7 ppm), atom H-28 ( $\delta_H$  0,92 ppm) memiliki korelasi dengan atom C-22, C-23, C-25 ( $\delta_C$  131,9; 135,7 dan 33,4 ppm). Spektrum HMQC dan HMBC isolat 1 ditunjukkan pada Gambar 4.5.



**Gambar 4.5** Struktur Kimia Korelasi HMBC dan HMQC Senyawa Isolat 1

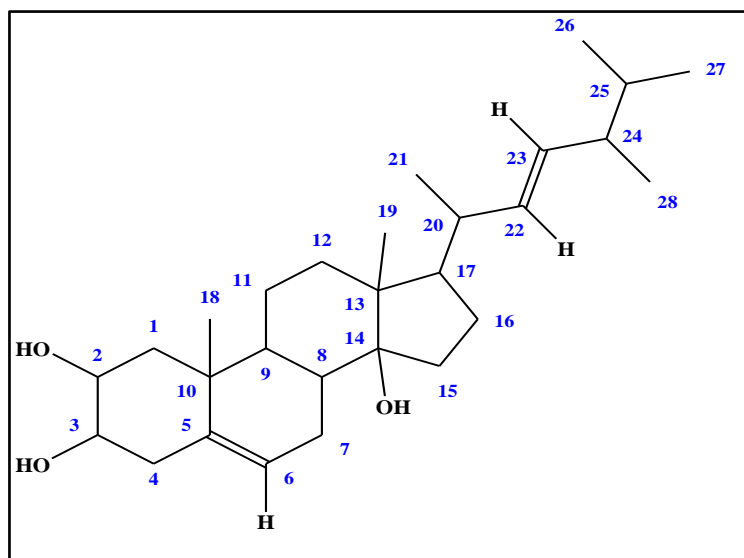
Perbandingan data spektroskopi senyawa isolat 1 dengan senyawa Ergosta-7,22-diene-2,3,9-triol (Lin *et al.*, 1991) dan Ergosta-5,22-diene-3-ol (Jinming *et al.*, 2001; Suleimen *et al.*, 2021), menunjukkan bahwa senyawa memiliki kesamaan nilai geseran kimia, dapat dilihat pada Tabel 4.22.

**Tabel 4.22** Data hasil NMR Isolat 1 dibandingkan dengan Literatur (Lin *et al.*, 1991), (Jinming *et al.*, 2001)

Posisi C	Ergosta-7,22-diene- 2,3,9-triol		Isolat 1		Ergosta-5,22-diene- 3-ol		Ket
	H-NMR	C-NMR	H-NMR	C-NMR	H-NMR	C-NMR	
1	1.64; 1.39	39.3	1.52	39.1	-	37.5	CH <sub>2</sub>
2	3.25	73.4	3.54	67.0	-	32.0	CH-OH
3	3.25 (m)	71.7	3.67 (m)	72.9	3.53 (m)	72.0	CH-OH
4	1.68; 1.43	34.3	2.23; 1.98	39.4	-	42.6	CH <sub>2</sub>
5	1.45	42.1	-	142.4	-	141.0	C=C
			5.27 (t, 6.6Hz)	117.7	5.35 (d, 5.2 Hz)	121.9	CH
6	2.04; 1.79	29.6	-	32.6	-	32.2	CH <sub>2</sub>
7	5.37	117.8	-	32.6	-	32.2	CH <sub>2</sub>
8	-	143.5	1.45	33.0	-	33.3	CH
9	-	75.3	1.52	54.6	-	50.5	CH
10	-	37.3	-	40.5	-	36.8	C
11	1.56; 1.31	27.6	1.21	21.7	-	21.3	CH <sub>2</sub>
12	1.34; 1.09	39.3	-	40.5	-	39.9	CH <sub>2</sub>
13	-	43.8	-	43.0	-	42.6	C
14	2.17	55.0	-	75.5	-	57.1	C-OH

15	1.64; 1.39	24.1	1.39	22.7	-	24.5	CH <sub>2</sub>
16	1.60; 1.35	27.5	1.7	27.9	-	28.7	CH <sub>2</sub>
17	-	56.4	-	54.6	-	56.4	CH
18	1.04 (s)	17.6	0.65 (s)	17.3	0.69 (s)	12.3	C-CH <sub>3</sub>
19	1.04 (s)	14.3	1.06 (s)	11.5	0.83 (s)	20.1	C-CH <sub>3</sub>
20	2.33	40.2	2.33	43.0	-	40.3	CH
21	1.11 (d, 7.4 Hz)	20.2	1.04 (d, 7 Hz)	20.3	1.00 (d, 6.5 Hz)	21.2	CH <sub>3</sub>
22	5.48 (m)	135.2	5.22 (m)	135.7	5.17 (m)	136.1	C=C
23	5.48 (m)	132.5	5.25 (m)	131.9	5.20 (m)	132.0	CH
24	1.86	42.9	2.15	43.4	-	43.0	CH
25	2.33	33.1	1.86	33.4	-	33.3	CH-CH <sub>3</sub>
26	1.11 (d, 5.6 Hz)	19.0	0.84 (d, 9.5 Hz)	19.1	0.84 (d, 6.5 Hz)	19.8	CH <sub>3</sub>
27	0.91 (m)	20.8	0.85 (d, 9.5 Hz)	18.7	0.91 (d, 6.8 Hz)	19.6	CH <sub>3</sub>
28	0.91 (m)	20.8	0.94 (d, 7 Hz)	16.8	1.01 (d, 6.5 Hz)	17.8	CH <sub>3</sub>

Berdasarkan hasil karakterisasi dengan menggunakan KLT, FTIR, MS dan NMR pada senyawa 1 serta perbandingan NMR dengan literatur penelitian sebelumnya, menunjukkan bahwa senyawa isolat 1 diprediksi kemungkinan senyawa Ergosta-5,22-diene-2,3,14-triol. Struktur kimia isolat 1 ditunjukkan pada Gambar 4.6..



**Gambar 4.6** Struktur Kimia Senyawa Isolat 1 (Ergosta-5,22-diene-2,3,14-triol)

#### 4.7.4 Data Hasil Pengukuran Spektrofotometri IR Senyawa 3

Pada spektrum IR (Lampiran 26) menunjukkan adanya puncak pada bilangan gelombang 3200 menunjukkan adanya gugus (C-OH), 2960 menunjukkan adanya gugus (CH), 1543 dan 1464  $\text{cm}^{-1}$  menunjukkan adanya ikatan (C=C) dan 1049 adanya gugus (C-O).

#### 4.7.5 Data Hasil Pengukuran GCMS Senyawa Isolat 3

Senyawa Isolat 3 (Lampiran 27) mempunyai berat molekul (BM) 412, dengan adanya puncak ion (M+H) 413 dan rumus molekul  $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$ .

#### 4.7.6 Data Hasil Pengukuran NMR Senyawa Isolat 3

Pada hasil spektrum H-NMR (Lampiran 28) menunjukkan adanya enam signal metil yang beresonansi pada 0.68 (s), 1.01 (s), 1.25 (s), 0.92 (d, 9 Hz), 0.82 (3H, d, 6.4 Hz) dan 0.83 (3H, d, 6.1 Hz).

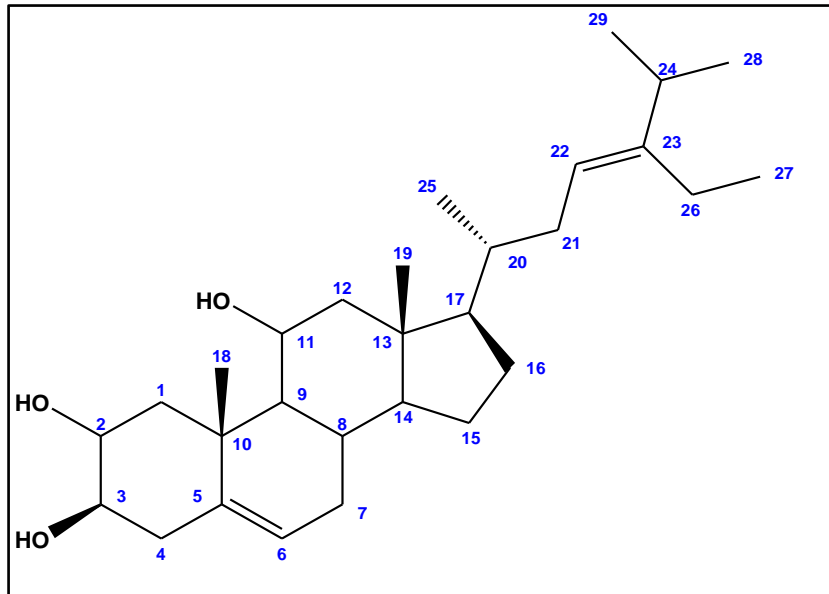
Pada spektrum C-NMR (lampiran 29) diperjelas dengan percobaan DEPT  $135^\circ$  menunjukkan adanya 29 sinyal karbon metil yang beresonansi pada  $\delta_c$  12,1; 12,3; 19,4; 21,2; 21,3; 19,1 dan 25.6 ppm. Adanya satu signal oksimetin pada  $\delta_c$  71,9, adanya metin olefinik pada  $\delta_c$  121,8; 138,5; 129,4 ppm serta ada signal karbon olefinik singlet pada  $\delta_c$  140,8 ppm.

Perbandingan data spektroskopi senyawa isolat 3 dengan senyawa stigmasterol (Katja, 2021) menunjukkan bahwa kedua senyawa memiliki kesesuaian yang sangat tinggi dengan demikian senyawa diidentifikasi sebagai stigmasterol pada Gambar 4.7. Hasil karakterisasi senyawa isolat 3 dibandingkan dengan senyawa stigmasterol yang berhasil diisolasi dari tumbuhan *Chisocheton celebicus koord* yang dijabarkan pada Tabel 4.23.

**Tabel 4. 23** Nilai Geseran Kimia H dan C NMR pada senyawa isolat 3 dan perbandingan dengan literatur Stigmasterol (Katja, 2021)

Posisi C	Stigmasterol		Isolat 3		Ket
	H-NMR	C-NMR	H-NMR	C-NMR	
1	1.08;1.84 (m)	37.4	1.84 (m)	37.3	CH <sub>2</sub>
2	1.49; 1.81 (m)	31.8	1.82 (m)	31.7	CH <sub>2</sub>
3	3.52 (m)	72.0	3.52 (m)	71.9	CH-OH
4	2.28;2.30 (dd, 2.0;5.2)	42.5	2.28;2.30 (dd)	42.3	CH <sub>2</sub>
5	-	140.9	-	140.8	C=C
6	5.35 (d, 5.2)	121.9	5.34 (d, 5.5)	121.8	CH
7	1.54;1.96 (m)	32.1	1.50 (m)	31.9	CH <sub>2</sub>
8	1.46 (m)	32.0	1.46 (m)	32.0	CH
9	0.94 (m)	50.3	0.92 (m)	50.1	CH
10	-	36.7	-	37.3	C
11	1.46;1.49 (m)	21.3	1.46;1.49 (m)	21.1	CH <sub>2</sub>
12	1.15;1.95 (m)	39.9	1.15;1.95 (m)	37.2	CH <sub>2</sub>
13	-	42.5	-	42.3	C
14	1.03 (m)	56.9	1.05 (m)	56.0	CH
15	1.07;1.56 (m)	24.5	1.07;1.57 (m)	24.3	CH <sub>2</sub>
16	1.26;1.67 (m)	28.4	1.27;1.66 (m)	29.8	CH <sub>2</sub>
17	1.13 (m)	56.1	1.13 (m)	56.8	CH
18	0.67 (s)	12.1	0.68 (d, 9.5)	12.3	CH <sub>3</sub>
19	1.00 (s)	19.5	1.01 (s)	19.4	CH <sub>3</sub>
20	2.02 (m)	40.7	2.00 (m)	39.8	CH
21	0.92 (d, 6.5)	21.2	0.91 (d, 6.5)	21.2	CH <sub>3</sub>
22	5.16 (dd, 8.5;15.0)	138.5	5.15 (dd, 8.5;15.0)	138.4	C=C
23	5.00 (dd, 8.5;15.0)	129.5	5.02 (dd, 8.5;15.0)	129.3	CH
24	1.53 (m)	51.4	1.57 (m)	50.1	CH
25	1.45 (m)	31.8	1.47 (m)	31.9	CH <sub>2</sub>
26	0.84 (d, 6.4)	21.3	0.85 (d, 9)	21.1	CH
27	0.82 (d, 6.1)	19.1	0.81 (d, 4.5)	19.1	CH <sub>3</sub>
28	1.15 (t, 3.2)	25.6	1.15 (t)	24.3	CH <sub>3</sub>
29	0.80 (t, 6.0)	12.2	0.80 (t, 8.5)	12.3	CH <sub>3</sub>

Berdasarkan hasil karakterisasi dengan menggunakan KLT, FTIR, GCMS, dan NMR menunjukkan bahwa isolat 3 merupakan senyawa stigmasterol dengan rumus kimia yang ditunjukkan pada Gambar 4.18. Senyawa stigmasterol juga telah berhasil diisolasi dari tumbuhan suku Meliaceae lainnya yaitu *C. Celebicus* (Katja, 2021).



**Gambar 4.7** Struktur Kimia Senyawa Isolat 3 (Stigmasterol)

## **BAB 5**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **5.1 Kesimpulan**

Kesimpulan yang didapatkan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Ekstrak n-heksan (ENH) daun mimba memiliki aktivitas antibakteri *P.acne* yang paling kuat dengan nilai KBM 5%, dilanjutkan ekstrak etil asetat (EEA) daun mimba memiliki aktivitas antibakteri *P.acne* kuat dengan nilai KBM 10%.
2. Fraksi G dari ekstrak n-heksan daun mimba teraktif dengan nilai KBM 250 ppm memiliki aktivitas antibakteri *P.acne*, serta fraksi L dari ekstrak etil asetat daun mimba memiliki aktivitas antibakteri *P.acne* dengan nilai KBM 250 ppm.
3. Evaluasi dari isolat ekstrak n-heksan teraktif adalah isolat 1 yang memiliki nilai KBM 50 ppm pada aktivitas antibakteri *P.acne* dan *S.epidermidis*, sedangkan isolat ekstrak etil asetat teraktif adalah isolat 3 yang memiliki nilai KBM 100 ppm pada aktivitas antibakteri *P.acne* dan *S.epidermidis*.
4. Karakterisasi senyawa dari isolat 1 menunjukkan struktur senyawa Ergosta-5,22-diene-2,3,14-triol, sedangkan isolat 3 menunjukkan struktur senyawa stigmasterol.

#### **5.2 Saran**

Adapun saran yang dapat diberikan berdasarkan hasil penelitian ini adalah:

Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk melakukan evaluasi struktur senyawa yang didapat, agar prediksi senyawa yang didapatkan tepat pengolahan datanya.

## DAFTAR REFERENSI

- Adi. (2008). *Tanaman Obat Dan Jus*. Agromedia Pustaka, Jakarta
- Afriyanti, R. N. (2015). Akne Vulgaris Pada Remaja. *Medical Faculty of Lampung University*, 4(6), 102–109.
- Albayrak, Sevil; Atasagun, Bayram; Aksoy, & Ahmet. Comparison of phenolic components and biological activities of two *Centaurea* sp. obtained by three extraction techniques. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 2017, 10.6: 599-606.
- Anief, M. (2002). *Formulasi Obat Topikal Dengan Dasar Penyakit Kulit*. Penerbit Gadjah Mada University Press.
- Azmir, J., *et al* (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426-436.
- Azwanida, N. N. (2015). A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Medicinal & Aromatic Plants*, 4(3) : 1-6. <http://dx.doi.org/10.4172/2167-0412.1000196>.
- Brooks, F. G., Carroll, karen C., Butel, J. S., Morse, S. A., & Mietzner, T. A. (2010). *Mikrobiologi Kedokteran* (25th ed.). Buku Kedokteran EGC.
- Brunton, L., Parker, K., & Blumenthal, D. (2008). *Goodman & Gilman: Manual Farmakologi dan Terapo* (Terjemahan). Buku Kedokteran EGC.
- Cayme, J., & Ragasa, C. (2004). Structure elucidation of  $\beta$ -stigmasterol and  $\beta$ -sitosterol from *Sesbania grandiflora* (Linn). Pers. And  $\beta$ -carotene from *Heliotropium indicum* Linn by NMR spectroscopy. *Journal of Kimika*. 20(1/2), 5-12.
- Crane, J. K., Hohman, D. W., Nodzo, S. R., & Duquin, T. R. (2013). Antimicrobial susceptibility of *Propionibacterium acnes* isolates from shoulder surgery. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1128/AAC.00463-13>.
- Cronquist, A., (1981), *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*, New York, Columbia University Press, 477.
- Coskun, O. (2016). Separation techniques: chromatography. *Northern clinics of Istanbul*, 3(2), 156.

- Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. (2000). Parameter Standar Umum Ekstrak Tanaman Obat. *Departemen Kesehatan RI*. (Vol. 1, pp. 10–11).
- Faizah Sodirun, Ari Hayati, Hasan Zayadi, (2016). Persepsi Masyarakat Tradisional Pulau Mandangin Kabupaten Sampang terhadap Tanaman Mimba (*Azadirachta indica* Juss). *e-Jurnal Ilmiah Bioscience-Tropic*. (Vol. 2, Hal. 11-18).
- Field, L. D., Sternhell, S. and Kalman, J. R. (2013). *Organic Structures from Spectra*. Fifth Edit. United Kingdom: John Wiley & Sons, Ltd.
- Harmita. (2006). *Buku Ajar Analisis Fisikokimia*. Depok: Departemen Farmasi
- Hamid Nour, A., Sandanasamy, J., Hamid, A., Nizam, S., & Hamid, A. (2014). Chemical Characterization and Biological Study of *Azadirachta indica* Extracts. *European Journal of Academic Essays ISSN*.
- Herawati, Tuti (2004). *Mimba (Azadirachta indica Juzz): Tanaman Multimanfaat Potensial untuk Rehabilitasi Lahan*. (Makalah) Penunjang pada Ekspose Penerapan Hasil Litbang Hutan & Konservasi Alam. Palembang.
- Heyne, K. (1987). *Tumbuhan Berguna Indonesia, Volume II*, Yayasan Sarana Wana Jaya : Diedarkan oleh Koperasi Karyawan, Badan Litbang Kehutanan, Jakarta.
- Identification of Organic Compounds, Seventh Edition. USA: John Willey
- Indonesia, D. K. (2014). *Farmakope Indonesia (V)*. Kementrian Kesehatan RI.
- Islas JF, Acosta E, G-Buentello Z, Delgado-Gallegos JL, Moreno-Treviño MG, Escalante B, *et al* (2020). An overview of Neem (*Azadirachta indica*) and its potential impact on health. *Journal of Functional Foods*.
- Jawetz, E., Melnick, J.L. & Adelberg, E.A., (2005). *Mikrobiologi Kedokteran*, diterjemahkan oleh Mudihardi, E., Kuntaman, Wasito, E. B., Mertaniasih, N. M., Harsono, S., Alimsardjono, L., Edisi XXII, 327-335, 362-363, Penerbit Salemba Medika, Jakarta.
- Jenie, U. A., Kardono, L. B., Rumampuk, M. H. R. J., & Darmawan, A. (2014). *Teknik Modern Spektroskopi NMR: Teori Dan Aplikasi Dalam Elusidasi Struktur Molekul Organik*.
- Jinming, G., Lin, H., & Jikai, L. (2001). A novel sterol from Chinese truffles *Tuber indicum*. *Steroids*. [https://doi.org/10.1016/S0039-128X\(01\)00105-2](https://doi.org/10.1016/S0039-128X(01)00105-2).

- Juariyah, S., & Sari, W. P. (2018). Pemanfaatan Limbah Cair Industri Tahu Sebagai Media Alternatif Pertumbuhan *Bacillus* sp. *Jurnal Analisis Kesehatan Klinik Sains*, 6(1), 24–29.
- Kabau S. (2012). Hubungan Antara Pemakaian Jenis Kosmetik Dengan Kejadian Akne Vulgaris. Semarang. Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Skripsi.
- Kalangi, S. J. R. (2014). Histofisiologi Kulit. *Jurnal Biomedik (Jbm)*, 5(3), 12–20. <https://doi.org/10.35790/jbm.5.3.2013.4344>.
- Katja, D. G. (2021). Senyawa Stigmasterol (Steroid) Dari Kulit *Chisocheton celebicus* koord (Meliaceae). *Chemistry Progress*.
- Kristanti, A. N. (Ed.). (2019). *Fitokimia*. Airlangga University Press.
- Kumar, Vinay, Cotran, et al. (2007). Buku Ajar Patologi Anatomi Edisi 7 Vol. 2. Jakarta : EGC pp 367-378.
- Lin, C. N., Tome, W. P., & Won, S. J. (1991). Novel cytotoxic principles of formosan ganoderma lucidum. *Journal of Natural Products*. <https://doi.org/10.1021/np50076a012>.
- Iinuma K, Noguchi N, Nakaminami H, Sasatsu M, Nishijima S, Tsuboi I. (2011). Susceptibility of *Propionibacterium acnes* isolated from patients with acne vulgaris to zinc ascorbate and antibiotics. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. doi: 10.2147/CCID.S23840.
- Mahmudah, F. L., & Atun, S. (2017). Uji Aktivitas Antibakteri dari Ekstrak Etanol Temu Kunci (*Boesenbergia pandurata*) Terhadap Bakteri *Streptococcus mutans*. *Journal of Petrology*, 22(1), 59–66.
- Mandal, S. C., Mandal, V., & Das, A. K. (2015). Essentials of Botanical Extraction: Principles and Applications. In *Essentials of Botanical Extraction: Principles and Applications*. <https://doi.org/10.1016/C2014-0-02889-4>
- Mas Rufah. (2020). Uji Aktivitas Ekstrak Etanol Daun Mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) Terhadap Bakteri *Propionibacterium acnes*. Skripsi; UIN Sunan Ampel, Surabaya.
- Nast, A., Dréno, B., Bettoli, V., Degitz, K., et al. (2012). European Evidencebased (S3) Guidelines for the Treatment of Acne. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*.; 26: p1–29.

- Nugroho, R.A. (2013). Terapi Topikal Clindamisin Dibandingkan dengan Niacinamide + Zinc pada Acne Vulgaris. Skripsi. Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro.
- Oprica, C. (2007). Characterisation of antibiotic-resistant propionibacterium acnes from acne vulgaris and other diseases. In *Forum for Nordic Dermato- Venerology* (Vol. 12, Issue 2).
- Pandey, S., Satpathy, G., & Gupta, R. K. (2014). Evaluation of nutritional, phytochemical, antioxidant and antibacterial activity of exotic fruit " Limonia acidissima ". *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry JPP*, 3(32), 81– 8881.
- Pelczar, M. J. dan E. C. S. Chan. (1986). Dasar-dasar Mikrobiologi, Jilid I. Jakarta: Universitas Indonesia.
- Pramasanti. (2008), Perawatan Jerawat, kesehatan. Diakses 3 Juli 2022.
- Pratiwi, S.T., (2008). Mikrobiologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Erlangga Universitas Gadjah Mada.
- Ruhana Afifi, Euis Erlin, Jetti Rachmawati. (2018). Uji Anti Bakteri Ekstrak Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L) Terhadap Zona Hambat Bakteri Jerawat *Propionibacterium acnes* Secara In Vitro.
- Safitri, R., & Novel, S. sasika. (2010). Medium Analisis Mikroorganisme. Penerbit Trans Info Media.
- Sapkale, G.N, Patil, S.M, Surwase U.S & Bhatbhage, P.K. (2010). ‘Supercritical Fluid Extraction’, *Int. J. Chem, Sci*, vol.8, no.2, hh 729-743
- Schlegel, Hans G. (1994). Mikrobiologi Umum. Gadjah Mada University Press: Yogyakarta
- Setiawansyah, A., Hakim, A., & Wirasisya, D. G. (2019). Evaluasi Dan Karakterisasi Golongan Senyawa Potensial Antibakteri Pada Daun Dan Kulit Batang (*Azadirachta indica* A. Juss) Terhadap *Escherichia coli*. *Jurnal Tumbuhan Obat Indonesia*. <https://doi.org/10.22435/jtoi.v11i2.1003>.
- Shahid, M., & Yusuf, M. (2015). Plant phenolics: A Review on Modern extraction techniques. *Researchgate*, 41(11). <https://doi.org/10.1111/1753-0407.12032>
- Soedarto. (2015). Mikrobiologi Kedokteran. CV. Sagung Seto.
- Stahl, E. (1969). Thin-Layer Chromatography. doi:10.1007/978-3-642-88488-7.
- Subandi. (2014). Mikrobiologi: Kajian Dalam Perspektif Islam. PT. Remaja Rosdakarya.
- Sukrasno dan T. Lentera. (2003). Mimba, Tanaman Obat Multifungsi. Agromedia Pustaka, Jakarta.

- Suleimen, Y. M., Metwaly, A. M., Mostafa, A. E., Elkaeed, E. B., Liu, H. W., Basnet, B. B., Suleimen, R. N., Ishmuratova, M. Y., Turdybekov, K. M., & Van Hecke, K. (2021). Isolation, Crystal Structure, and in Silico Aromatase Inhibition Activity of Ergosta-5, 22-dien-3  $\beta$  -ol from the Fungus *Gyromitra esculenta*. *Journal of Chemistry*. <https://doi.org/10.1155/2021/5529786>.
- Utami, P., & Puspaningtyas, D. E. (2013). *The Miracle of Herbs*. Jakarta: PT Agro Media Pustaka.
- Vashist, H. dan Anil, J. (2012). Antimicrobial activities of medicinal plants: Review. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 3(1),222-230.
- Wahjuni, S., Puspawati, N. M., & Arista, N. P. R. E. (2016). Isolasi Dan Identifikasi Senyawa Aktif Antijamur Dari Daun Mimba (*Azadiracantha indica* A. Juss.) Sebagai Pengendali *Fusarium sp.* Pada Tanaman Buah Naga (*Hylocereus sp.*). *Jurnal Kimia*. <https://doi.org/10.24843/jchem.2016.v10.i02.p05>.
- Waluyo, L. (2007). *Mikrobiologi Umum*. UMM Press.
- William, D., Fleming, I. (2014). *Metode Spektroskopi Dalam Kimia Organik*. Jakarta: EGC.
- Wojcikowski, Ken, *et al.*. (2007) Antioxidant capacity of 55 medicinal herbs traditionally used to treat the urinary system: a comparison using a sequential three- solvent extraction process. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 13.1: 103-110
- Yanti, Y. N., & Mitika, S. (2017). Uji Efektivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Sambilotto (*Andrographis paniculata* Nees) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Ilmiah Ilmu Sina*, 2(1), 158–168.
- Yayli, N. & Baltaci, C. (1996). The sterols of *Cyclamen coum*. *Turkish Journal of Chemistry*. 20(4), 329-334.
- Zaenglein AL, Graber EM, Thiboutot DM, Strauss JS. (2012). Acne vulgaris and acneiform eruption. Dalam: Goldsmith LA, Katz SI, Gilchrist BA, Paller AS, Leffell DJ, Wolff K, editors. *Fitzpatrick's dermatology in general medicine*. 8th ed. New York: McGraw-Hill; p690-703.
- Zhang, Q. W., Lin, L. G., & Ye, W. C. (2018). Techniques for extraction and

isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese Medicine* (United Kingdom), 13(1), 1–26. <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>

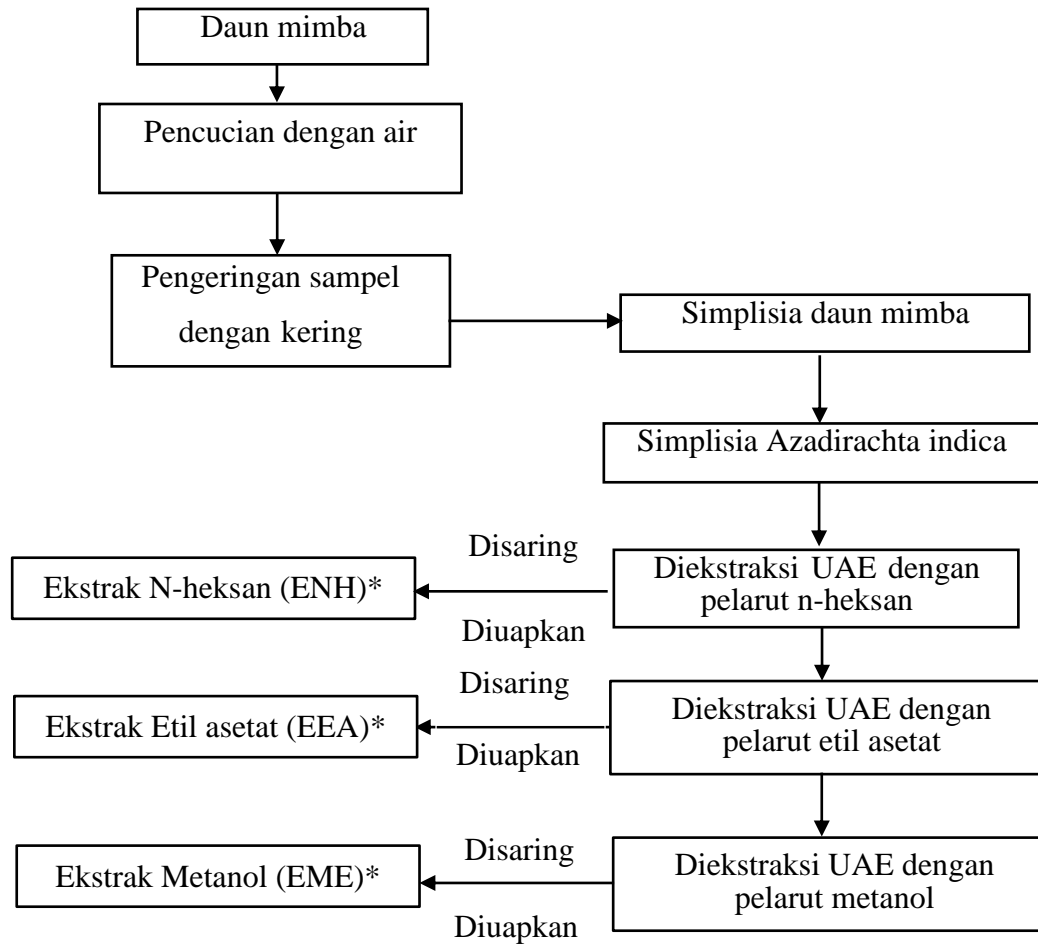
# LAMPIRAN

## Lampiran 1. Bagan Penelitian

### Alur Penelitian

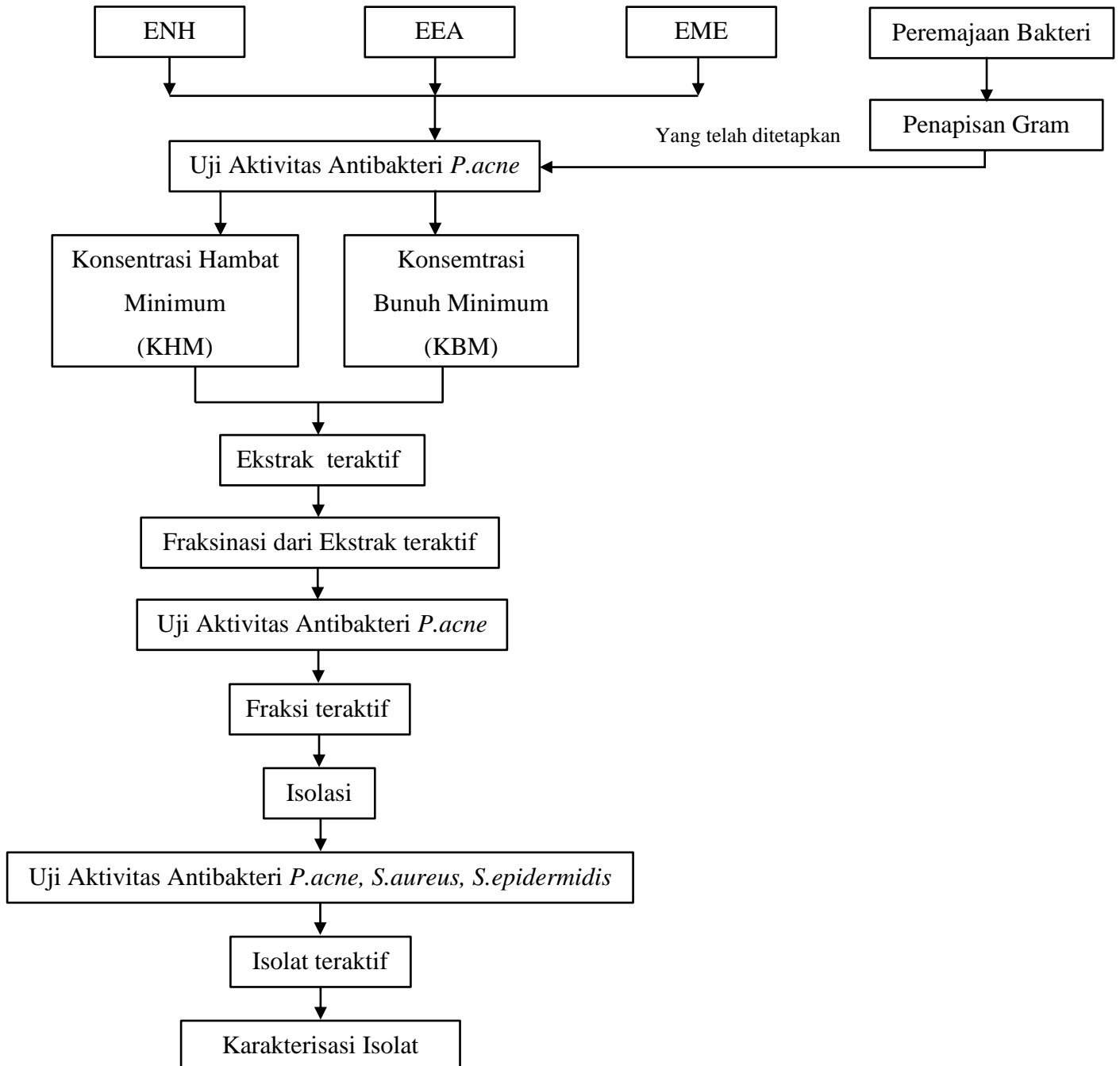
Penelitian ini terdiri dari dua tahap, yaitu :

Tahap 1 : Penyiapan Simplisia dan Ekstraksi



**Lampiran 1 (Lanjutan)**

Tahap 2 : Uji Aktivitas Antibakteri Jerawat hingga karakterisasi



Lampiran 2. Surat Determinasi *A. indica*

LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA  
(INDONESIAN INSTITUTE OF SCIENCES)  
PUSAT PENELITIAN BIOLOGI  
(RESEARCH CENTER FOR BIOLOGY)

Cibinong Science Center, Jl. Raya Jakarta - Bogor KM. 46 Cibinong 16911  
Telp. (+62 21) 87907636 - 87907604, Fax. 87907612  
Website : www.biologi.lipi.go.id



Cibinong, 12 Januari 2021

Nomor : B-75/IV/DI.01/1/2021  
Lampiran : -  
Perihal : Hasil identifikasi/determinasi Tumbuhan

Kepada Yth.  
Bpk./Ibu/Sdr(i). **Annysa Ellycornia Silvyana**  
NPM : 2006508463  
Universitas Indonesia  
Fakultas Farmasi  
Kampus UI, Depok 16424

Dengan hormat,

Bersama ini kami sampaikan hasil identifikasi/determinasi tumbuhan yang Saudara kirimkan ke "Herbarium Bogoriense", Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI Bogor, adalah sebagai berikut :

No.	No. Kol.	Jenis	Suku
1.	Daun Mimba	<i>Azadirachta indica</i> A.Juss.	Meliaceae

Demikian, semoga berguna bagi Saudara.

Koordinator Program Penelitian Botani


Dr. Himmah Rustiemi, S.P., M.Sc.  
NIP.197106052000032005

Kepala Pusat Penelitian Biologi LIPI

Dr. Adit Kerti, S.Si, M.Sc  
NIP.196814021994032002

*D:\Identifikasi Mahasiswa 2021 (Sudah dikasih nomor surat)\Annysa Ellycornia Silvyana 010793.docx\Yayah-Gede*

### Lampiran 3. Sertifikat Pengujian Klindamisin Hidroklorida



**BADAN POM RI**  
**SERTIFIKAT PENGUJIAN**  
**KLINDAMISIN HIDROKLORIDA**  
 No. Kontrol 212014

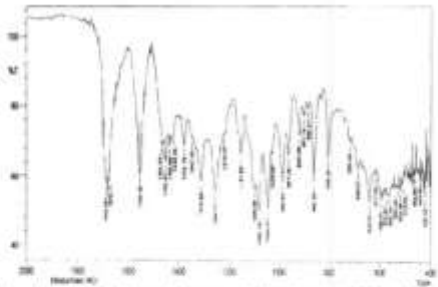
**Tujuan penggunaan :**  
*Klindamisin Hidroklorida* Baku Pembanding Farmakope Indonesia no kontrol 212014 dapat digunakan sebagai pembanding dalam identifikasi secara spektrofotometri inframerah dan kromatografi lapis tipis uji senyawa sejenis secara kromatografi cair kinerja tinggi, serta penetapan kadar secara kromatografi cair kinerja tinggi.

**Pemerian :** Serbuk hablur, putih atau praktis putih, tidak berbau atau sedikit berbau merkaptan.

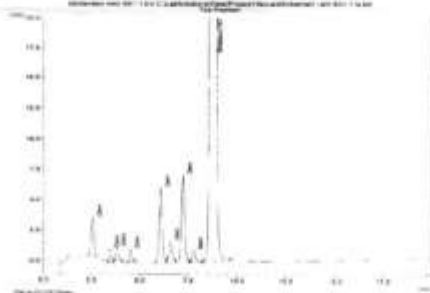
**Identifikasi :**

**Spektrofotometri inframerah :** Dispersi lebih kurang 2 mg zat dalam lebih kurang 200 mg kalium bromida menunjukkan spektrum inframerah seperti yang tercantum dalam gambar 1.

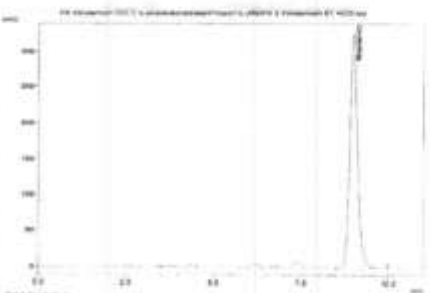
**Kromatografi lapis tipis :** Bercak pada kromatogram larutan uji sesuai posisi dan ukuran dengan bercak larutan baku *Clindamycin HCl* EPRS no. Lot n° 1b.



Gambar 1. Spektrum inframerah *Klindamisin Hidroklorida*



Gambar 2. Kromatogram KCKT senyawa sejenis *Klindamisin Hidroklorida*



Gambar 3. Kromatogram KCKT penetapan kadar *Klindamisin Hidroklorida*

**Kadar air :** 4,23% (n = 3, SD = 0,05%)


**Uji senyawa sejenis secara kromatografi cair kinerja tinggi :** Memenuhi kriteria Jumlah semua cemaran adalah 5,28%, dengan kromatogram seperti yang tercantum dalam gambar 2.

**Penetapan kadar :**  
**Kromatografi cair kinerja tinggi :** 89,58 ± 2,22%  $C_{18}H_{33}ClN_2O_5S$  (n = 18, RSDp = 1,43%) dihitung terhadap zat anhidrat, dengan kromatogram seperti yang tercantum dalam gambar 3.


**Kesimpulan :** *Klindamisin Hidroklorida* no. kontrol 212014 dapat dinyatakan sebagai Baku Pembanding Farmakope Indonesia sesuai dengan tujuan penggunaannya

**Wadah dan penyimpanan :** Dalam wadah tertutup rapat.

Kepala Pusat Pengujian Obat dan Makanan Nasional  
 u.p. Manajer Teknis Laboratorium Bahan Baku Pembanding



## Lampiran 4. Sertifikat Analisis Blood Agar

 Page 2 of 2

### CERTIFICATE OF ANALYSIS

**PRODUCT** CM0855B  
**BLOOD AGAR BASE** 500g

**LOT NUMBER** 2888793

---

**Growth of *Haemophilus* spp. in the presence of X & V factor discs**  
**Aerobic incubation at 37°C for 18 hours**

	X Factor (mm)	V Factor (mm)	X+V Factor (mm)
<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC®49247	0	0	17
<i>Haemophilus parainfluenzae</i> ATCC®33392	0	44	46

---

**Enriched with 7% v/v horse blood**  
**Bacitracin activity**  
**Aerobic incubation at 37°C for 18 hours**

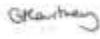
	Zone Size (mm)	Limits (mm)
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC®19615	20	10 - 22

---

Control Medium: Blood Agar Base


A satisfactory result is represented by recovery of positive strains equal to or greater than 70% of the control medium from an inoculum of 10-100 colony-forming units (cfu). Refer to product specification for full details.

The information given is believed to be correct, all results reported in this certificate relate only to the product and lot stated in this certificate of analysis. However, both the information and the product are offered without warranty for any application other than that specified in the current Oxoid Manual. This certificate shall not be reproduced except in full, without written approval of the Quality Control Laboratory, Oxoid Limited, Basingstoke. The results reported were obtained at the time of release.  
Lot Accepted: 2019.11.18



Carissa Courtney  
Director Quality, EMEA

ATCC is a registered trade mark of the American Type Culture Collection.  
NCTC and National Collection of Type Cultures are registered trade marks of the Health Protection Agency.



Tested by the Quality Control Laboratory  
OXOID LIMITED  
Wade Road, Basingstoke, Hampshire RG24 8PW, England  
oxid@thermofisher.com www.oxid.com

FDA Reg No. 801006

Certificate No. FM 08014

## Lampiran 5. Sertifikat Analisis Media BHIB

 Page 2 of 2

**CERTIFICATE OF ANALYSIS**

<b>PRODUCT</b>	<b>CM1135R</b>
	<b>BRAIN HEART INFUSION 2.5kg</b>
<b>LOT NUMBER</b>	<b>2942479</b>

---

**Tube coagulase test**

**Aerobic incubation at 37 ± 2°C for 4 hours**

<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC®9144	1E+04-1E+06	Positive
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC®14990	1E+04-1E+06	Negative

---

**Testing has been performed in accordance with ISO11133:2014**

**Aerobic incubation at 37 ± 2°C for 24 ± 2 hours**

<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC®25923	24	Turbid growth
---	----	---------------

---

**Tested in accordance with current CLSI M22 A**

**Aerobic incubation at 33-37°C for 18 hours**

<i>Escherichia coli</i> ATCC®25922	22	Turbid growth
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC®25923	24	Turbid growth

---

Control Media: Tryptone Soya Agar, Columbia Blood Agar Base enriched with 5% v/v horse blood, Columbia Blood Agar Base enriched with 5% v/v chocolate horse blood or Sabouraud Dextrose Agar, where appropriate

A satisfactory result is represented by visible growth from an inoculum of 10-100 colony-forming units (cfu).  
 For *Neisseria* species, a satisfactory result is represented by a positive diagnostic reaction, on subculture, from an inoculum of 10-100 cfu.  
 For Tube coagulase test, a satisfactory result is represented by the appropriate coagulase reaction from an inoculum of 1E+04 to 1E+06 cfu.  
 Refer to product specification for full details.

The information given is believed to be correct, all results reported in this certificate relate only to the product and lot stated in this certificate of analysis. However, both the information and the product are offered without warranty for any application other than that specified in the current Oxoid Manual. This certificate shall not be reproduced except in full, without written approval of the Quality Control Laboratory, Oxoid Limited, Basingstoke.  
 The results reported were obtained at the time of release.  
 Lot Accepted. 2020.03.06



Carissa Courtney  
 Director Quality, EMEA

ATCC is a registered trade mark of the American Type Culture Collection.  
 NCTC and National Collection of Type Cultures are registered trade marks of the Health Protection Agency.



Tested by the Quality Control Laboratory  
 OXOID LIMITED  
 Wade Road, Basingstoke, Hampshire RG24 0PW, England

Lampiran 6. Sertifikat Pengujian *P.acne*

bioMérieux Customer:  
System #: 7969

Printed Sep 7, 2021 06:52 ICT  
Printed by: LabTech

Patient Name: ATCC 11827, -  
Isolate: P. acne-1 (Approved)

Patient ID: P. acne

Card Type: ANC Bar Code: 2441828403303417 Testing Instrument: 0000148FF2BD (7969)  
Setup Technologist: Laboratory Technician(LabTech)

Bionumber: 6303000200001

Organism Quantity:

Selected Organism: *Propionibacterium acnes*

Comments:	

Identification Information	Card: ANC	Lot Number: 2441828403	Expires: May 10, 2022 12:00 ICT
	Completed: Sep 6, 2021 16:11 ICT	Status: Final	Analysis Time: 6:00 hours
Organism Origin	VITEK 2		
Selected Organism	99% Probability	<i>Propionibacterium acnes</i>	
	Bionumber: 6303000200001	Confidence:	Excellent identification
SRF Organism			
Analysis Organisms and Tests to Separate:			
Analysis Messages:			
Contraindicating Typical Biopattern(s)			

Biochemical Details																	
4	dGAL	-	5	LeuA	+	6	ELLM	+	7	PheA	+	8	ProA	+	9	PyrA	-
11	dCEL	-	13	TyrA	-	15	ATPA	-	18	dGLU	+	20	dMNE	+	22	dMAL	-
28	SAC	-	30	ARB	-	33	NAG	-	34	BGLU	-	36	URE	-	37	BGUR	-
39	BGALI	-	41	AARA	-	42	AGALI	-	43	BMAN	-	44	ARG	+	45	PVATE	-
51	MTE	-	53	ESC	-	54	BdFUC	-	55	BNAG	-	56	AMANI	(-)	57	AIFUC	-
59	PHOS	-	60	IARA	-	61	dRR2	(-)	62	OPS	(-)	63	AARAF	-	64	dXYL	-
	GRAM	+		MORPH	-		AERO	-									

Installed VITEK 2 Systems Version: 08.01  
MIC Interpretation Guideline:  
AES Parameter Set Name:

Therapeutic Interpretation Guideline:  
AES Parameter Last Modified:

Page 1 of 1



## Lampiran 7. Perhitungan Sampel Ekstrak, Fraksi, Isolat

### 1. Uji Aktivitas Ekstrak

100 mg ekstrak/ 300  $\mu$ L DMSO = 100% (166,666ppm)/well

100 mg ekstrak N-heksan/ 100  $\mu$ L DMSO = 100% (50.000ppm)/well

Diencerkan 10% : Kons. 100% = 100  $\mu$ L

BHIB = 400  $\mu$ L

Total = 500  $\mu$ L

5% : Kons. 10% = 250  $\mu$ L

BHIB = 250  $\mu$ L

Total = 500  $\mu$ L

2,5% : Kons. 5% = 250  $\mu$ L

BHIB = 250  $\mu$ L

Total = 500  $\mu$ L

1,25% : Kons. 2,5% = 250  $\mu$ L

BHIB = 250  $\mu$ L

Total = 500  $\mu$ L

0,625% : Kons. 12,5% = 250  $\mu$ L

BHIB = 250  $\mu$ L

Total = 500  $\mu$ L

0,32% : Kons. 0,625% = 250  $\mu$ L

BHIB = 250  $\mu$ L

Total = 500  $\mu$ L

0,16% : Kons. 0,32% = 250  $\mu$ L

BHIB = 250  $\mu$ L

Total = 500  $\mu$ L

0,08% : Kons. 0,16% = 250  $\mu$ L

BHIB = 250  $\mu$ L

Total = 500  $\mu$ L

0,04% : Kons. 0,08% = 250  $\mu$ L

BHIB = 250  $\mu$ L

Total = 500  $\mu$ L

**Lampiran 7 (Lanjutan)**

0,02% : Kons. 0,04%	= 250 $\mu$ L
BHIB	= 250 $\mu$ L
Total	= 500 $\mu$ L

**2 Uji Aktivitas Fraksi N-Heksan**

- Fraksi A (2 mg fraksi/1 mL DMSO = 1.000ppm)/well

Diencerkan 500ppm : 1.000ppm = 450  $\mu$ L

BHIB = 450  $\mu$ L

Total = 900  $\mu$ L

250ppm : 500ppm = 300  $\mu$ L

BHIB = 300  $\mu$ L

Total = 600  $\mu$ L

- Fraksi B (2 mg fraksi/1 mL DMSO = 1.000ppm)/well

Diencerkan 500ppm : 1.000ppm = 450  $\mu$ L

BHIB = 450  $\mu$ L

Total = 900  $\mu$ L

250ppm : 500ppm = 300  $\mu$ L

BHIB = 300  $\mu$ L

Total = 600  $\mu$ L

- Fraksi C (2 mg fraksi/1 mL DMSO = 1.000ppm)/well

Diencerkan 500ppm : 1.000ppm = 450  $\mu$ L

BHIB = 450  $\mu$ L

Total = 900  $\mu$ L

250ppm : 500ppm = 300  $\mu$ L

BHIB = 300  $\mu$ L

Total = 600  $\mu$ L

- Fraksi D (2 mg fraksi/1 mL DMSO = 1.000ppm)/well

Diencerkan 500ppm : 1.000ppm = 450  $\mu$ L

BHIB = 450  $\mu$ L

Total = 900  $\mu$ L

**Lampiran 7 (Lanjutan)**

$$250\text{ppm} : 500\text{ppm} = 300 \mu\text{L}$$

$$\text{BHIB} = 300 \mu\text{L}$$

$$\text{Total} = 600 \mu\text{L}$$

- Fraksi E (4 mg fraksi/1 mL DMSO = 2.000ppm)/well

$$\text{Diencerkan } 1.000\text{ppm} : 2.000\text{ppm} = 500 \mu\text{L}$$

$$\text{BHIB} = 500 \mu\text{L}$$

$$\text{Total} = 1.000 \mu\text{L}$$

$$500\text{ppm} : 1.000\text{ppm} = 500 \mu\text{L}$$

$$\text{BHIB} = 500 \mu\text{L}$$

$$\text{Total} = 1.000 \mu\text{L}$$

$$250\text{ppm} : 500\text{ppm} = 300 \mu\text{L}$$

$$\text{BHIB} = 300 \mu\text{L}$$

$$\text{Total} = 600 \mu\text{L}$$

- Fraksi F (3 mg fraksi/1 mL DMSO = 1.500ppm)/well

$$\text{Diencerkan } 1.000\text{ppm} : 1.500\text{ppm} = 800 \mu\text{L}$$

$$\text{BHIB} = 400 \mu\text{L}$$

$$\text{Total} = 1.200 \mu\text{L}$$

$$500\text{ppm} : 1.000\text{ppm} = 500 \mu\text{L}$$

$$\text{BHIB} = 500 \mu\text{L}$$

$$\text{Total} = 1.000 \mu\text{L}$$

$$250\text{ppm} : 500\text{ppm} = 300 \mu\text{L}$$

$$\text{BHIB} = 300 \mu\text{L}$$

$$\text{Total} = 600 \mu\text{L}$$

- Fraksi G (2 mg fraksi/1 mL DMSO = 1.000ppm)/well

$$\text{Diencerkan } 500\text{ppm} : 1.000\text{ppm} = 450 \mu\text{L}$$

$$\text{BHIB} = 450 \mu\text{L}$$

$$\text{Total} = 900 \mu\text{L}$$

$$250\text{ppm} : 500\text{ppm} = 300 \mu\text{L}$$

$$\text{BHIB} = 300 \mu\text{L}$$

$$\text{Total} = 600 \mu\text{L}$$

### Lampiran 7 (Lanjutan)

- Fraksi H (2 mg fraksi/1 mL DMSO = 1.000ppm)/well

Diencerkan 500ppm : 1.000ppm = 450  $\mu$ L

BHIB = 450  $\mu$ L

Total = 900  $\mu$ L

250ppm : 500ppm = 300  $\mu$ L

BHIB = 300  $\mu$ L

Total = 600  $\mu$ L

### 3. Uji Aktivitas Fraksi Etil Asetat

- Fraksi I (4 mg fraksi/1 mL DMSO = 2.000ppm)/well

Diencerkan 1.000ppm : 2.000ppm = 500  $\mu$ L

BHIB = 500  $\mu$ L

Total = 1.000  $\mu$ L

500ppm : 1.000ppm = 500  $\mu$ L

BHIB = 500  $\mu$ L

Total = 1.000  $\mu$ L

250ppm : 500ppm = 300  $\mu$ L

BHIB = 300  $\mu$ L

Total = 600  $\mu$ L

- Fraksi J (4 mg fraksi/1 mL DMSO = 2.000ppm)/well

Diencerkan 1.000ppm : 2.000ppm = 500  $\mu$ L

BHIB = 500  $\mu$ L

Total = 1.000  $\mu$ L

500ppm : 1.000ppm = 500  $\mu$ L

BHIB = 500  $\mu$ L

Total = 1.000  $\mu$ L

250ppm : 500ppm = 300  $\mu$ L

BHIB = 300  $\mu$ L

Total = 600  $\mu$ L

**Lampiran 7 (Lanjutan)**

- Fraksi K (2 mg fraksi/1 mL DMSO = 1.000ppm)/well
  - Diencerkan 500ppm : 1.000ppm = 450  $\mu$ L
  - BHIB = 450  $\mu$ L
  - Total = 900  $\mu$ L
  - 250ppm : 500ppm = 300  $\mu$ L
  - BHIB = 300  $\mu$ L
  - Total = 600  $\mu$ L
  
- Fraksi L (2 mg fraksi/1 mL DMSO = 1.000ppm)/well
  - Diencerkan 500ppm : 1.000ppm = 450  $\mu$ L
  - BHIB = 450  $\mu$ L
  - Total = 900  $\mu$ L
  - 250ppm : 500ppm = 300  $\mu$ L
  - BHIB = 300  $\mu$ L
  - Total = 600  $\mu$ L
  
- Fraksi M (3 mg fraksi/1 mL DMSO = 1.500ppm)/well
  - Diencerkan 1.000ppm : 1.500ppm = 800  $\mu$ L
  - BHIB = 400  $\mu$ L
  - Total = 1.200  $\mu$ L
  - 500ppm : 1.000ppm = 500  $\mu$ L
  - BHIB = 500  $\mu$ L
  - Total = 1.000  $\mu$ L
  - 250ppm : 500ppm = 300  $\mu$ L
  - BHIB = 300  $\mu$ L
  - Total = 600  $\mu$ L
  
- Fraksi N (2 mg fraksi/1 mL DMSO = 1.000ppm)/well
  - Diencerkan 500ppm : 1.000ppm = 450  $\mu$ L
  - BHIB = 450  $\mu$ L
  - Total = 900  $\mu$ L
  - 250ppm : 500ppm = 300  $\mu$ L
  - BHIB = 300  $\mu$ L
  - Total = 600  $\mu$ L

**Lampiran 7 (Lanjutan)**

## 4. Uji Aktivitas Isolat

(1 mg fisolat/1 mL DMSO = 500ppm)/well

Diencerkan 100ppm : 500ppm = 100  $\mu$ L

BHIB/NB = 400  $\mu$ L

Total = 500  $\mu$ L

50ppm : 100ppm = 250  $\mu$ L

BHIB/NB = 250  $\mu$ L

Total = 500  $\mu$ L

25ppm : 50ppm = 250  $\mu$ L

BHIB/NB = 250  $\mu$ L

Total = 500  $\mu$ L

### Lampiran 8. Perhitungan Suspensi Bakteri, Klindamisin

#### - Suspensi Bakteri *P.acne*

$$\frac{0,841}{0,3946} \times 9 \times 10^8 = 19,18 \times 10^8$$

#### - Pengenceran $10^7$

$$19,18 \times 10^8 = 21 \mu\text{L}$$

$$\text{BHIB} = 3.979 \mu\text{L}$$

$$\text{Total} = 4.000 \mu\text{L}$$

#### - Pengenceran $10^6$

$$10^7 = 3.630 \mu\text{L}$$

$$\text{BHIB} = 7.370 \mu\text{L}$$

$$\text{Total} = 11.000 \mu\text{L}$$

#### - Klindamisin (1 mg/ 5 ml aquadest steril = 100ppm)/well

$$\text{Diencerkan } 1,2\text{ppm} : 100\text{ppm} = 7 \mu\text{L}$$

$$\text{Aquadest} = 593 \mu\text{L}$$

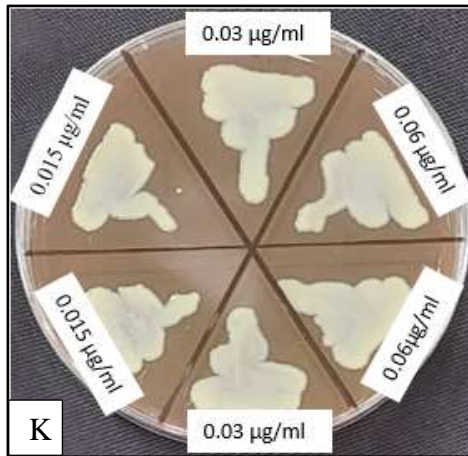
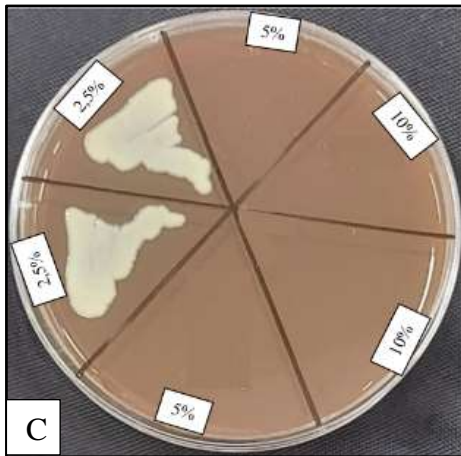
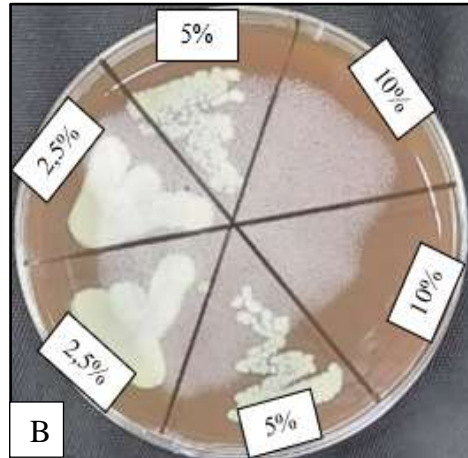
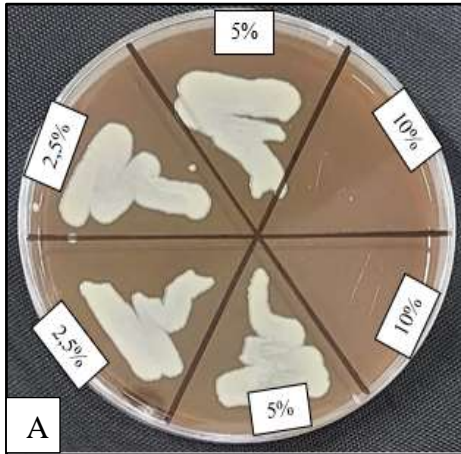
$$\text{Total} = 600 \mu\text{L}$$

$$0,6\text{ppm} : 0,6\text{ppm} = 300 \mu\text{L}$$

$$\text{Aquadest} = 300 \mu\text{L}$$

$$\text{Total} = 600 \mu\text{L}$$

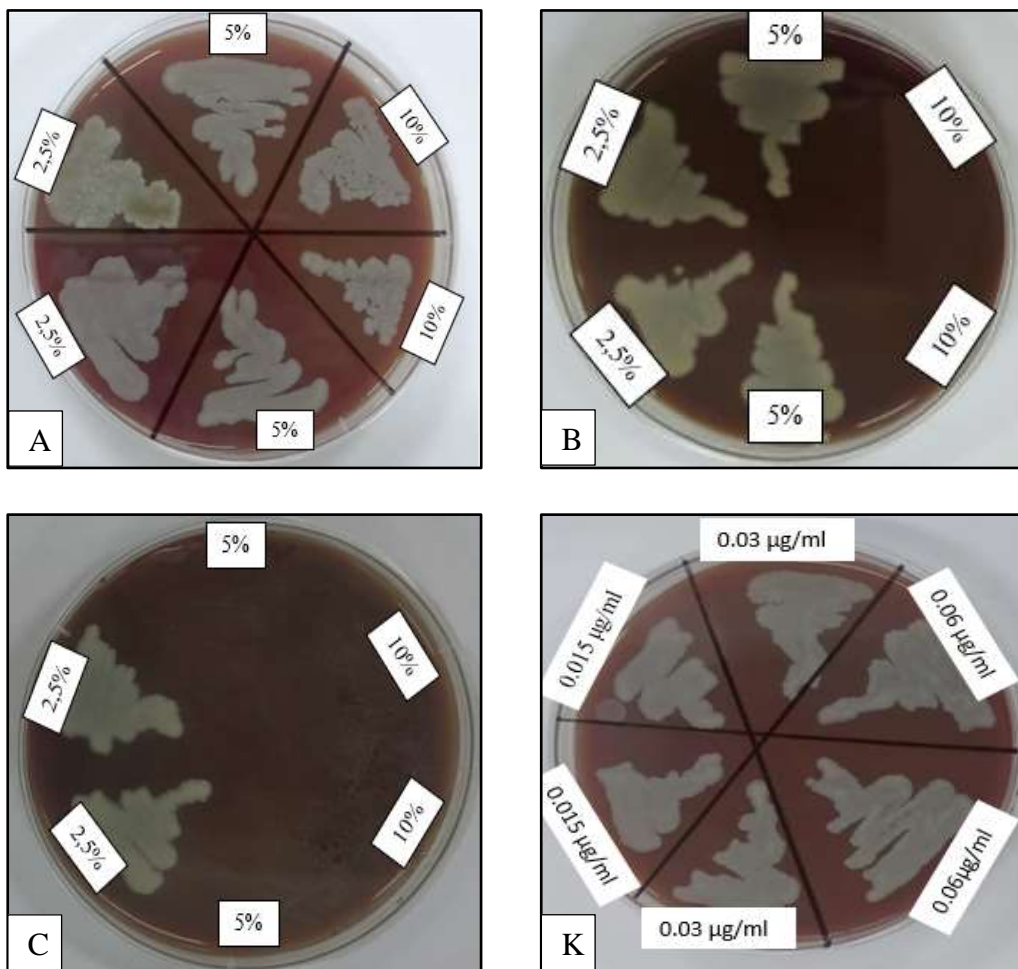
**Lampiran 9. Uji Aktivitas KBM Ekstrak Daun Mimba (Eksperimen 1)**



Keterangan :

- (A) Ekstrak Metanol
- (B) Ekstrak Etil Asetat
- (C) Ekstrak N-Heksan
- (D) Klindamisin

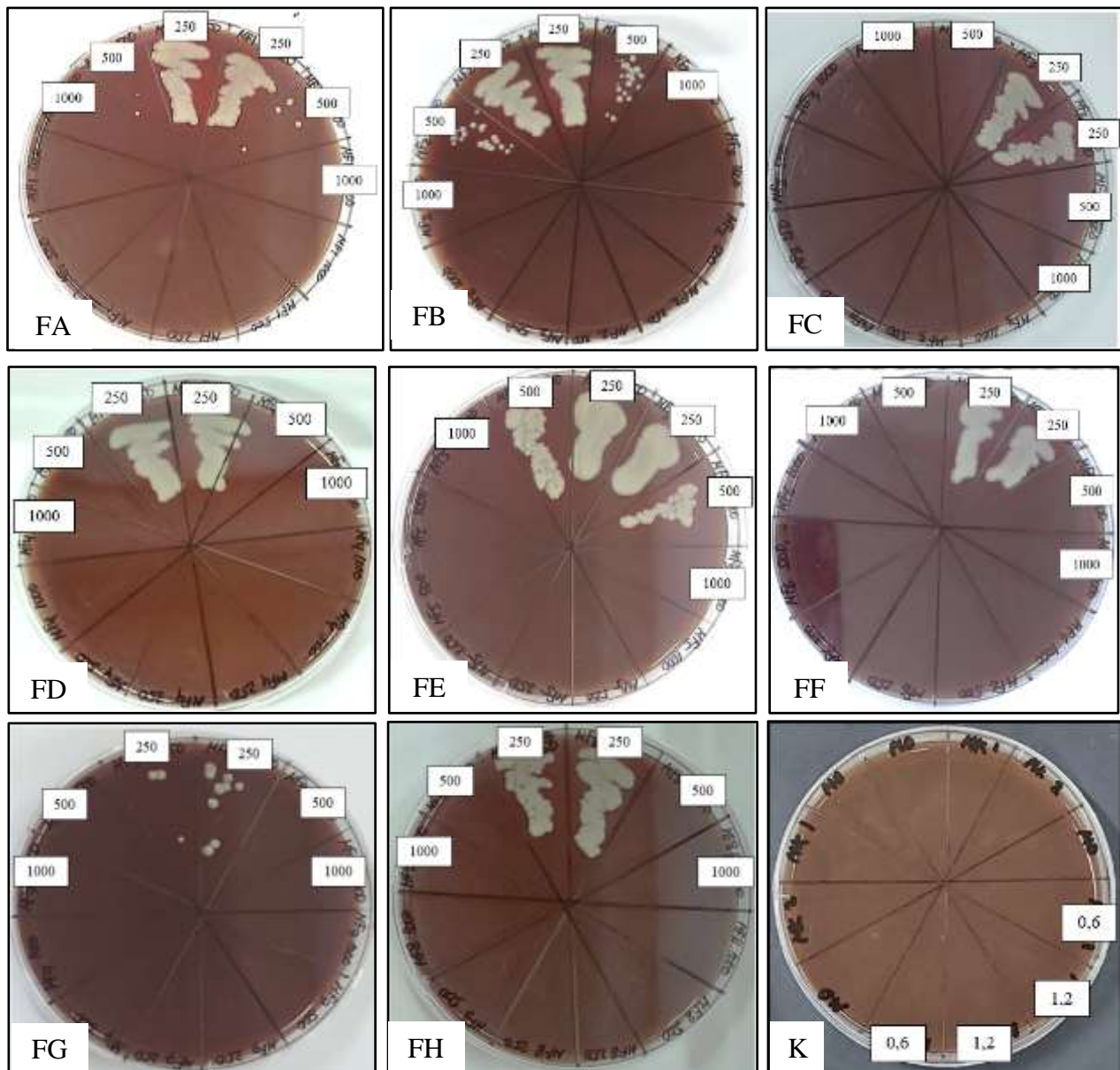
### Lampiran 10. Uji Aktivitas KBM Ekstrak Daun Mimba (Eksperimen 2)



Keterangan :

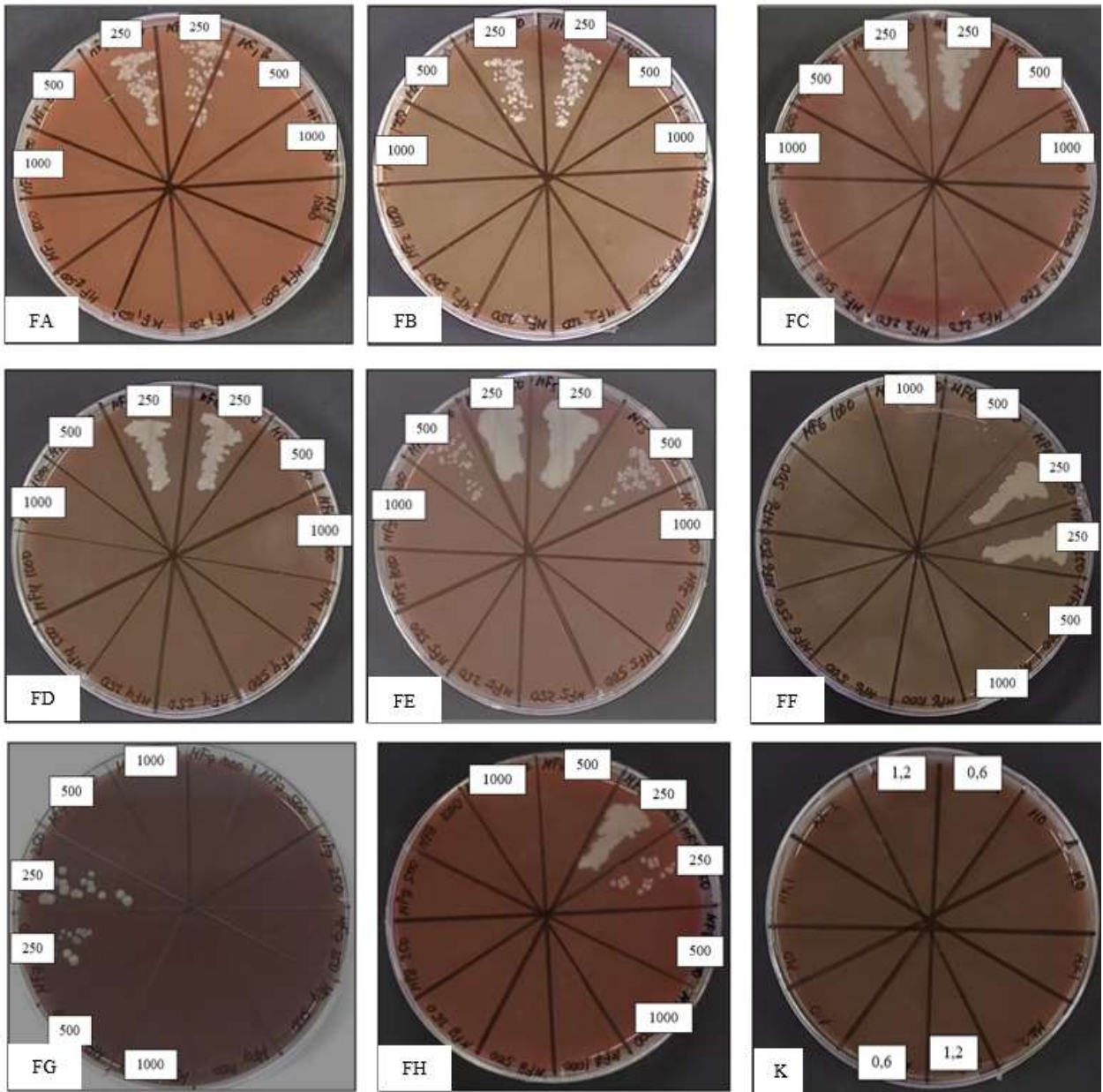
- (A) Ekstrak Metanol
- (B) Ekstrak Etil Asetat
- (C) Ekstrak N-Heksan
- (D) Klindamisin

**Lampiran 11. Uji Aktivitas KBM Fraksi Ekstrak N-Heksan Daun Mimba  
(Eksperimen 1)**



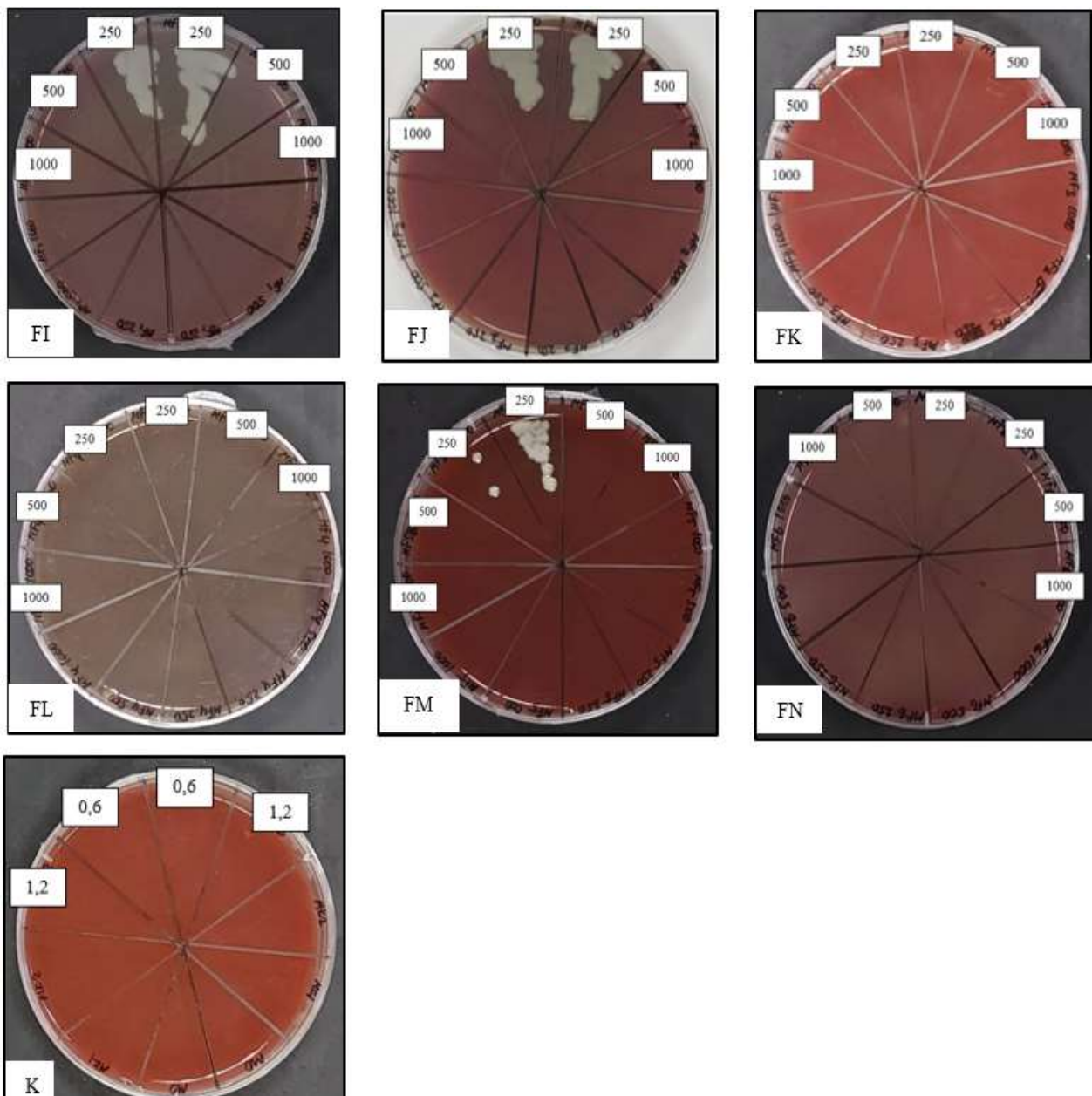
Keterangan : (FA) Fraksi 1, (FB) Fraksi 2, (FC) Fraksi 3, (FD) Fraksi 4, (FE) Fraksi 5, (FF) Fraksi 6, (FG) Fraksi 7, (FH) Fraksi 8, (K) Klindamisin

**Lampiran 12. Uji Aktivitas KBM Fraksi Ekstrak N-Heksan Daun Mimba  
(Eksperimen 2)**



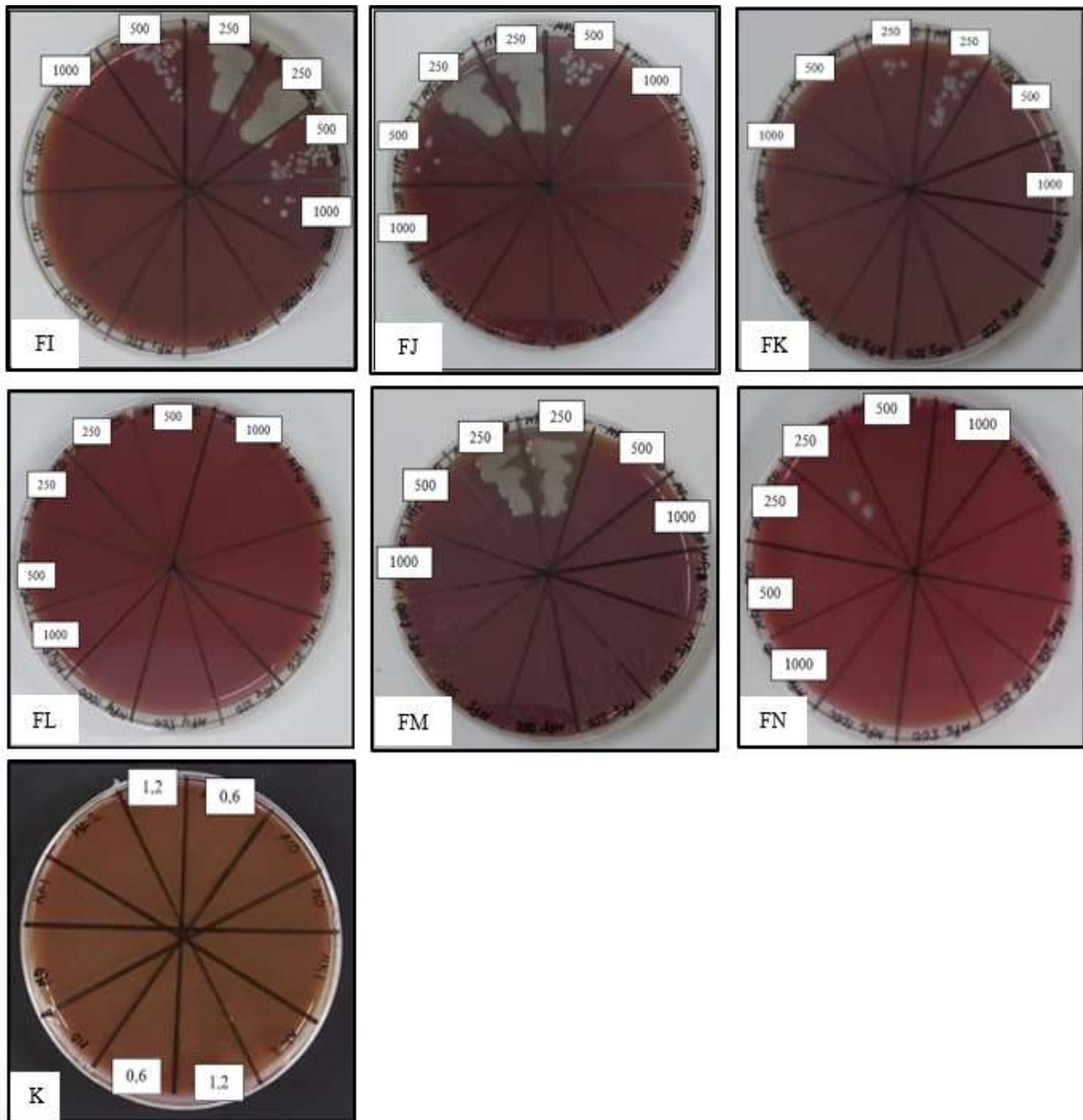
Keterangan : (FA) Fraksi 1, (FB) Fraksi 2, (FC) Fraksi 3, (FD) Fraksi 4, (FE) Fraksi 5, (FF) Fraksi 6, (FG) Fraksi 7, (FH) Fraksi 8, (K) Klindamisin

**Lampiran 13. Uji Aktivitas KBM Fraksi Ekstrak Etil Asetat Daun Mimba  
(Eksperimen 1)**



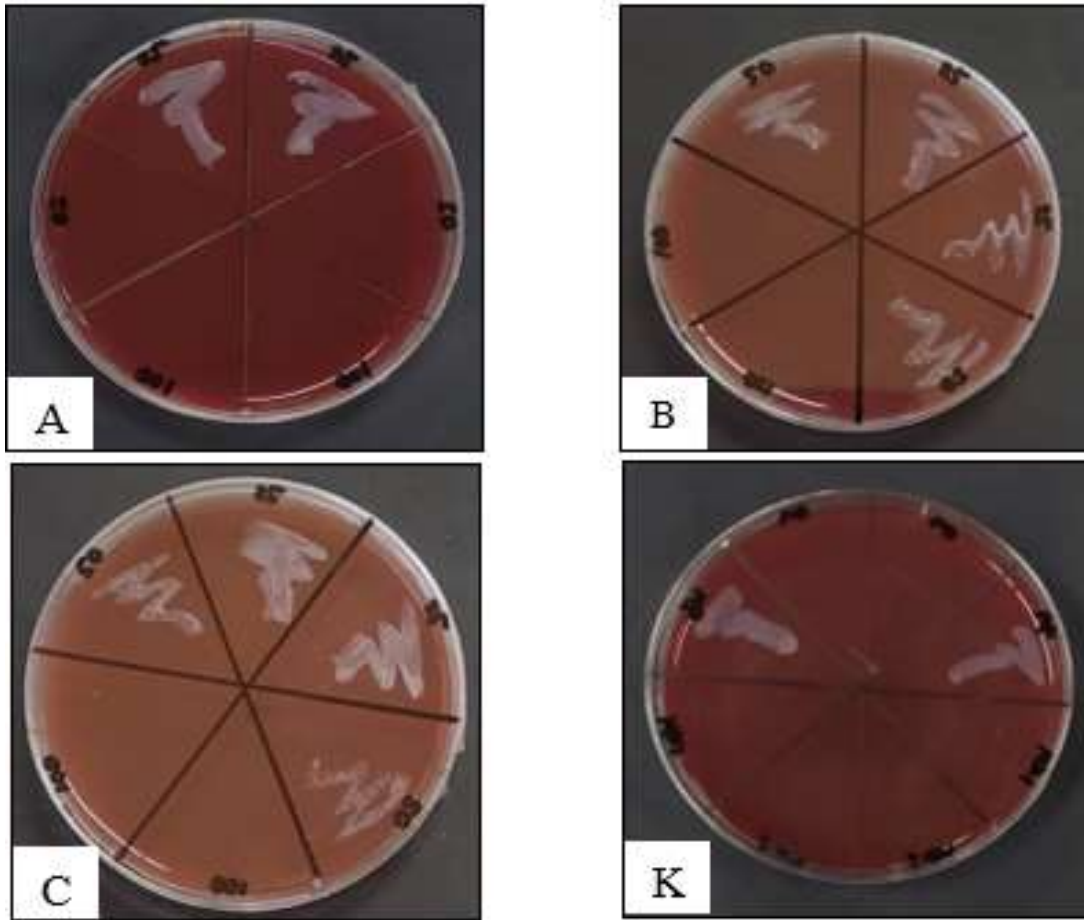
Keterangan : (FI) Fraksi 1, (FJ) Fraksi 2, (FK) Fraksi 3, (FL) Fraksi 4, (FM) Fraksi 5,  
(FN) Fraksi 6, (K) Klindamisin

**Lampiran 14. Uji Aktivitas KBM Fraksi Ekstrak Etil Asetat Daun Mimba  
(Eksperimen 2)**

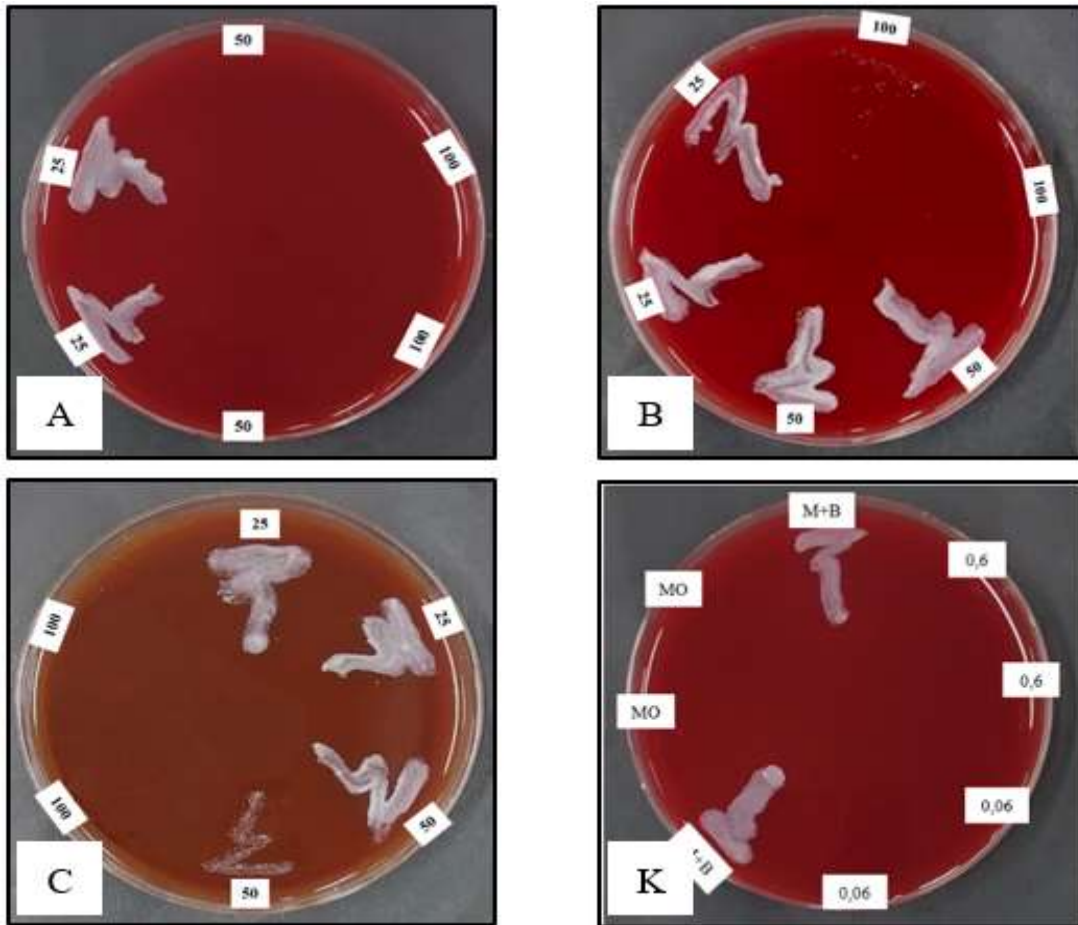


Keterangan : (FI) Fraksi 1, (FJ) Fraksi 2, (FK) Fraksi 3, (FL) Fraksi 4, (FM) Fraksi 5, (FN) Fraksi 6, (K) Klindamisin

Lampiran 15. Uji Aktivitas KBM Isolat pada *P.acne* (Eksperimen 1)

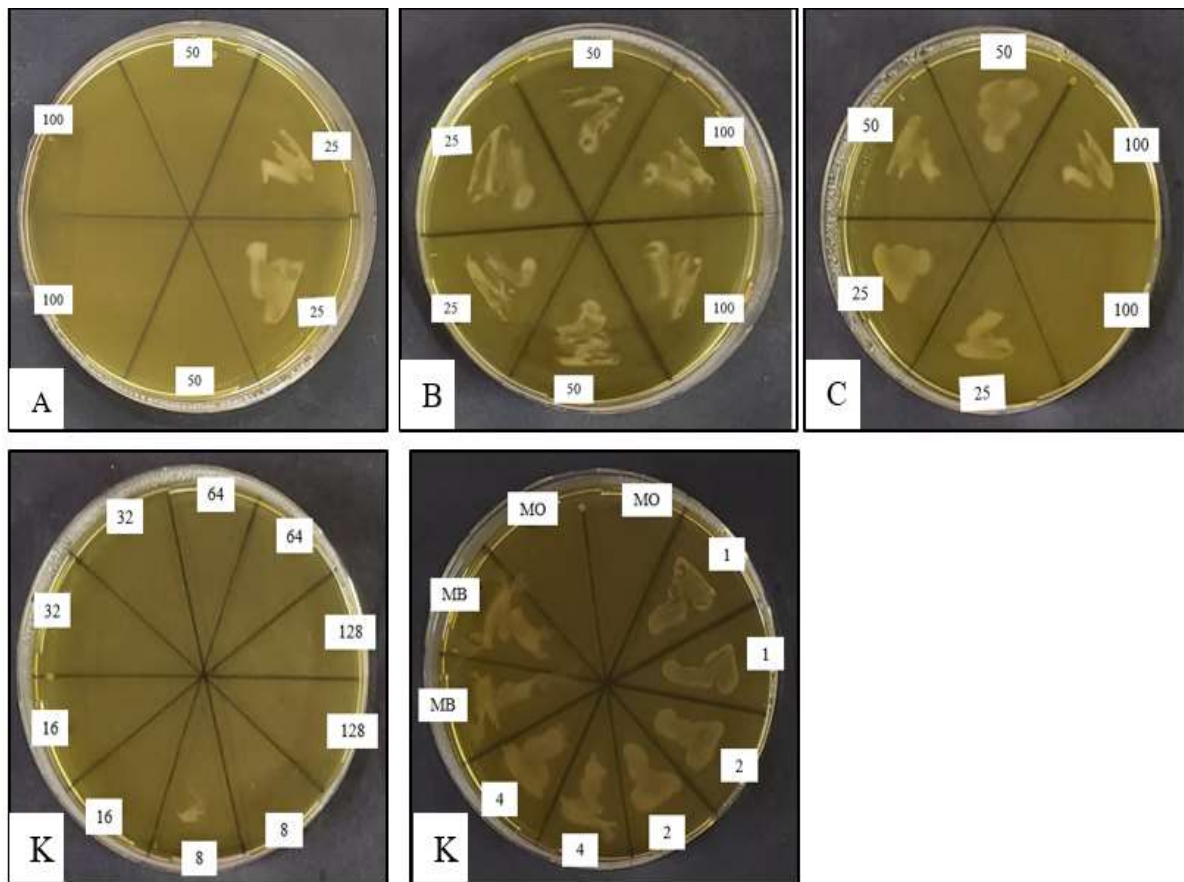


Keterangan : (A) Isolat 1, (B) Isolat 2, (C) Isolat 3, (K) Klindamisin

**Lampiran 16. Uji Aktivitas KBM Isolat pada *P.acne* (Eksperimen 2)**

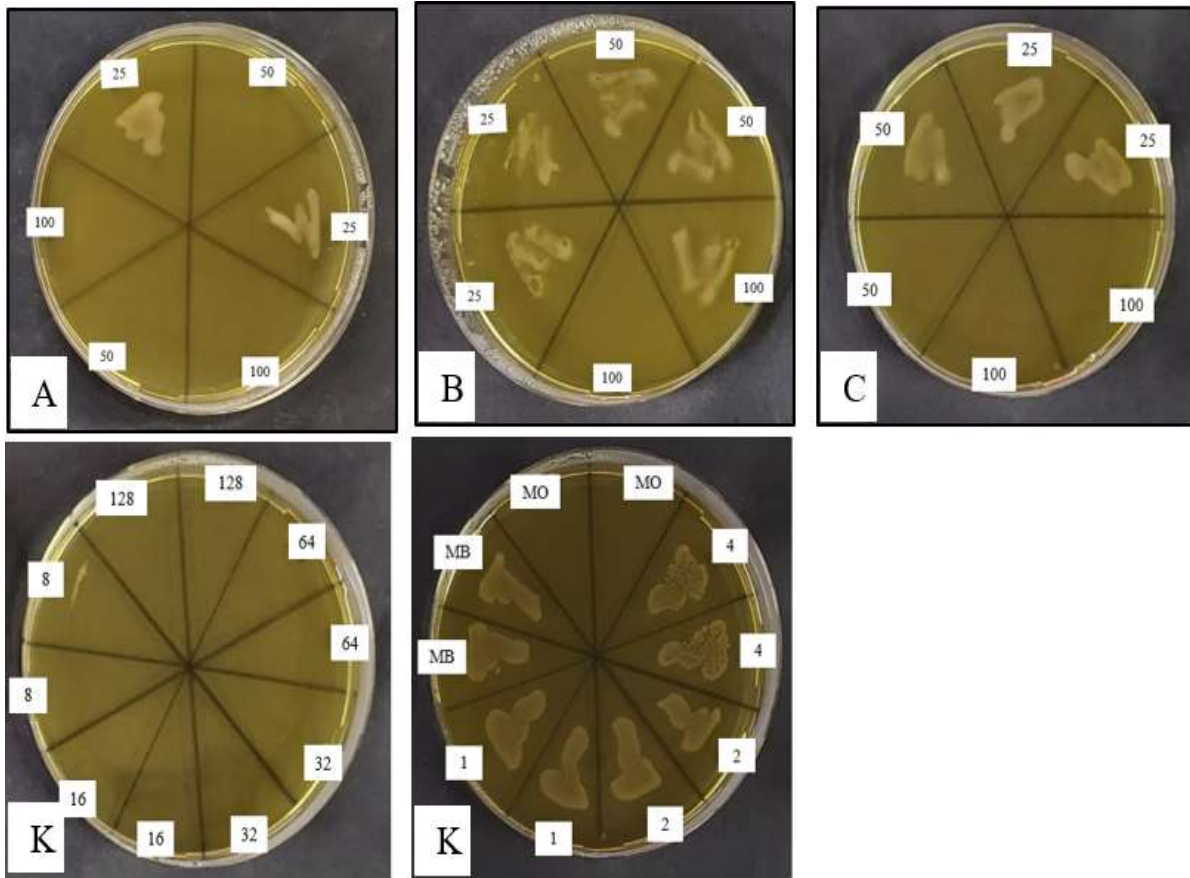
Keterangan : (A) Isolat 1, (B) Isolat 2, (C) Isolat 3, (K) Klindamisin

**Lampiran 17. Uji Aktivitas KBM Isolat pada *S.aureus* (Eksperimen 1)**

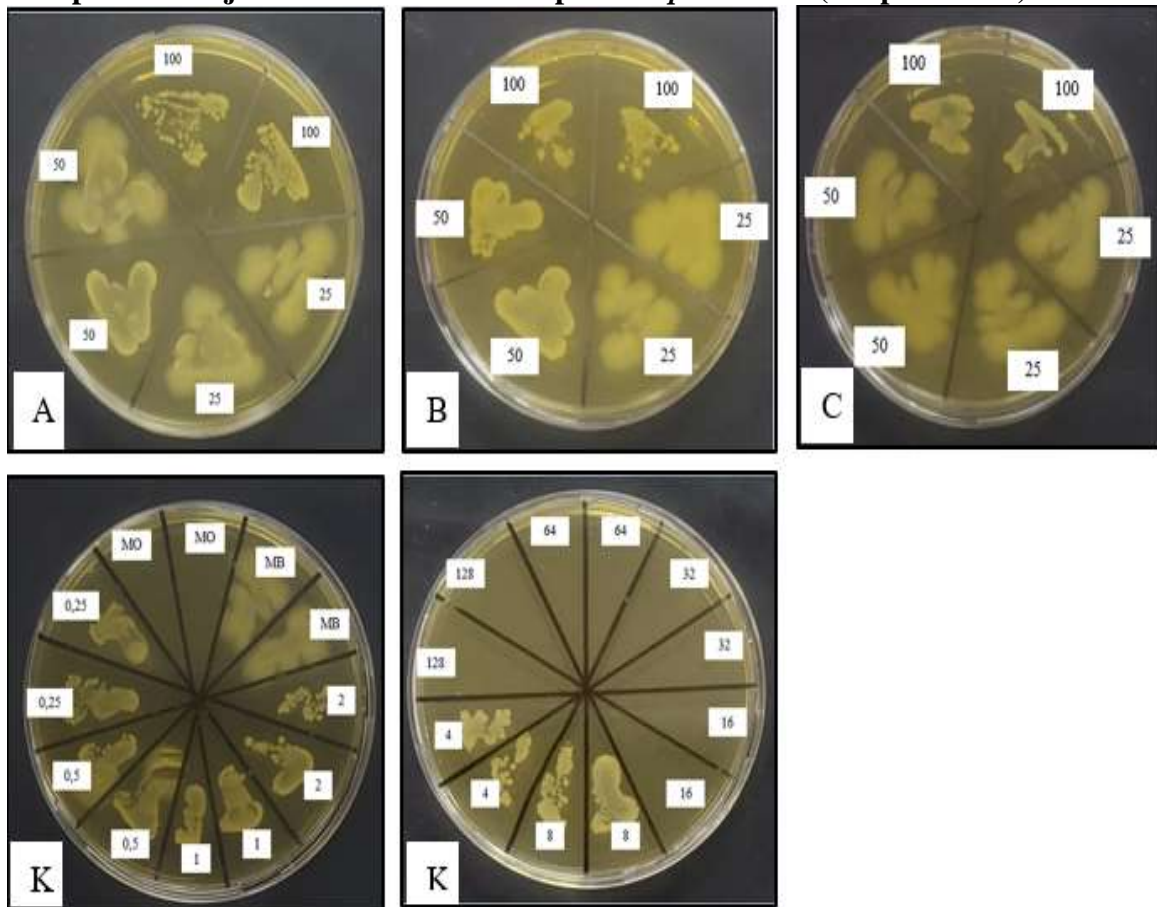


Keterangan : (A) Isolat 1, (B) Isolat 2, (C) Isolat 3, (K) Klindamisin

**Lampiran 18. Uji Aktivitas KBM Isolat pada *S.aureus* (Eksperimen 2)**

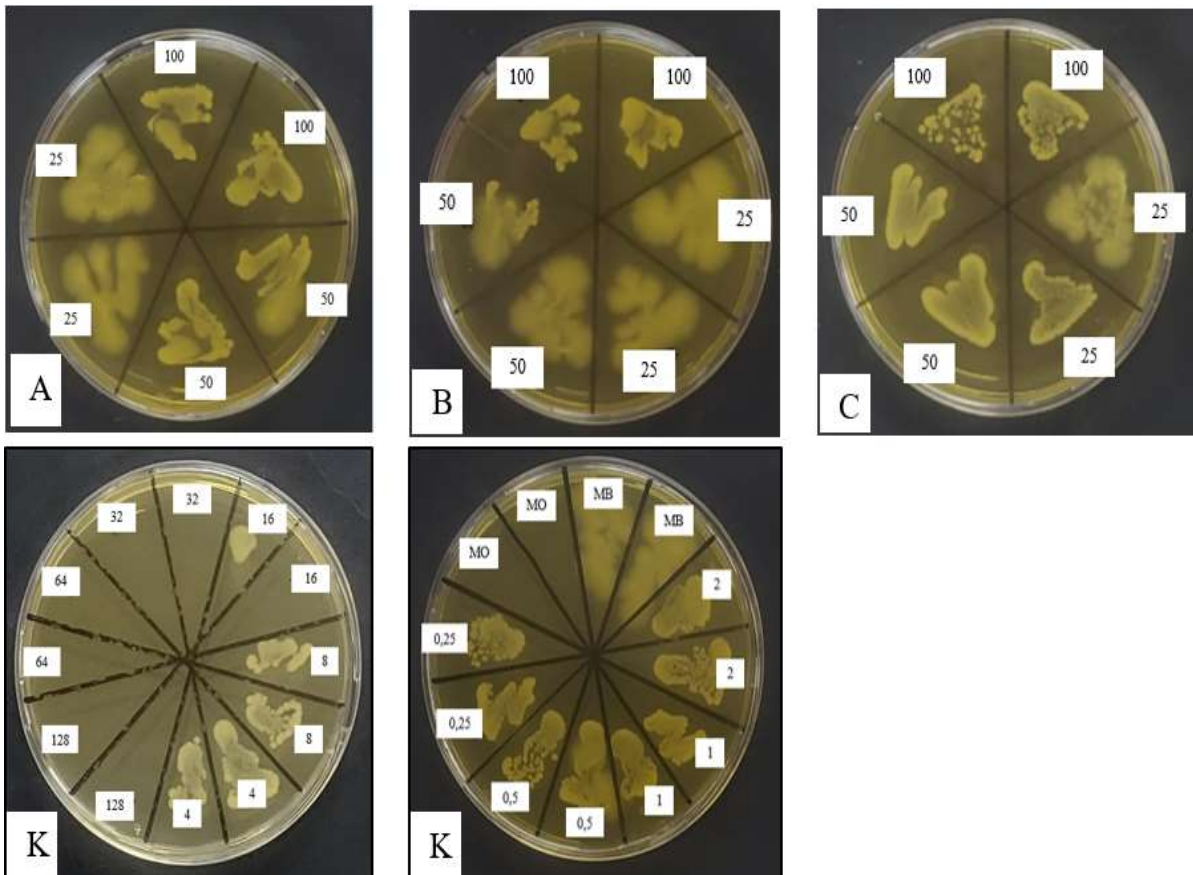


Keterangan : (A) Isolat 1, (B) Isolat 2, (C) Isolat 3, (K) Klindamisin

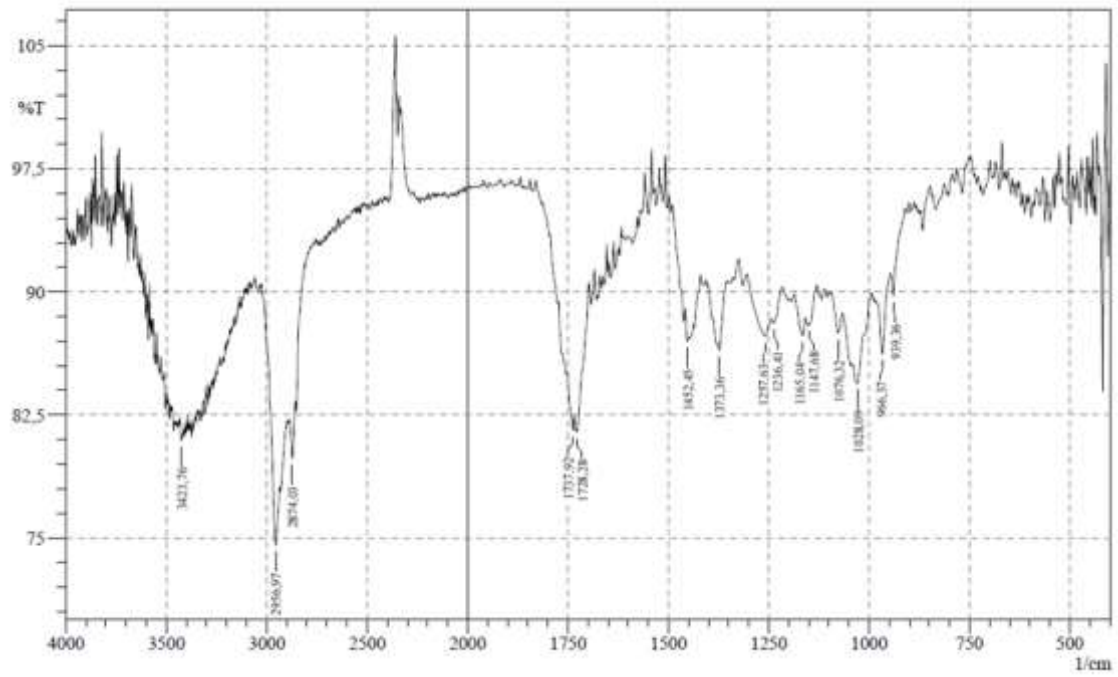
**Lampiran 19. Uji Aktivitas KBM Isolat pada *S.epidermidis* (Eksperimen 1)**

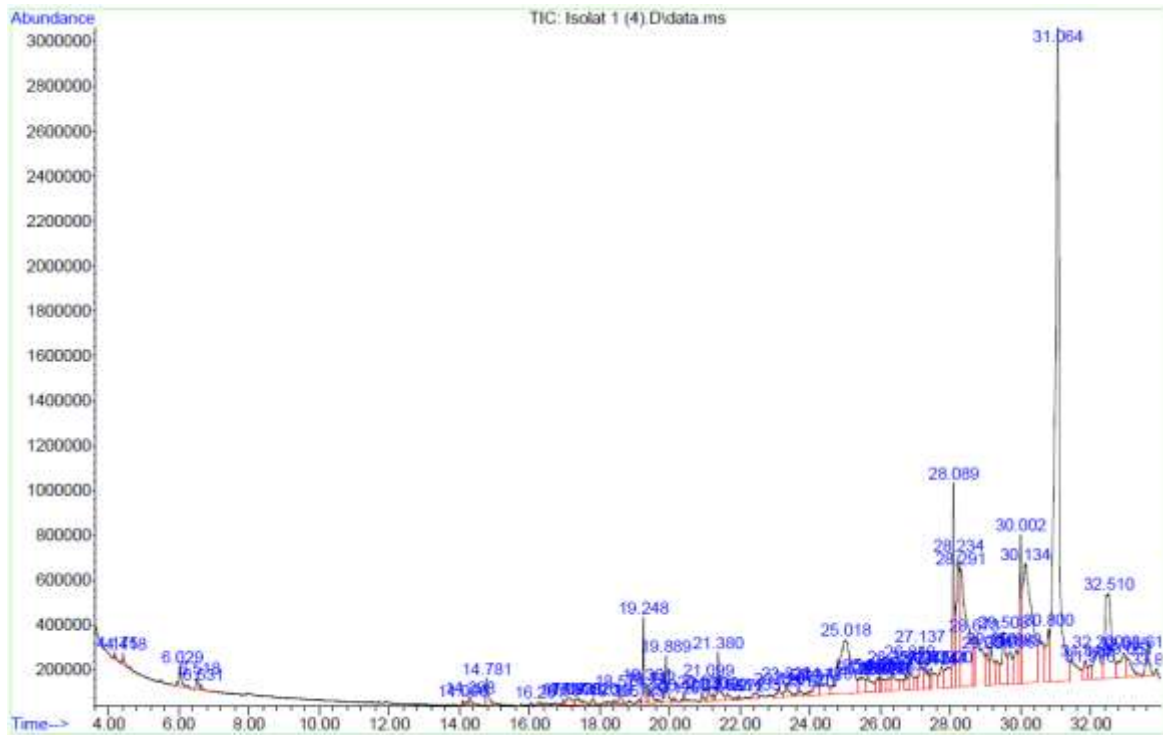
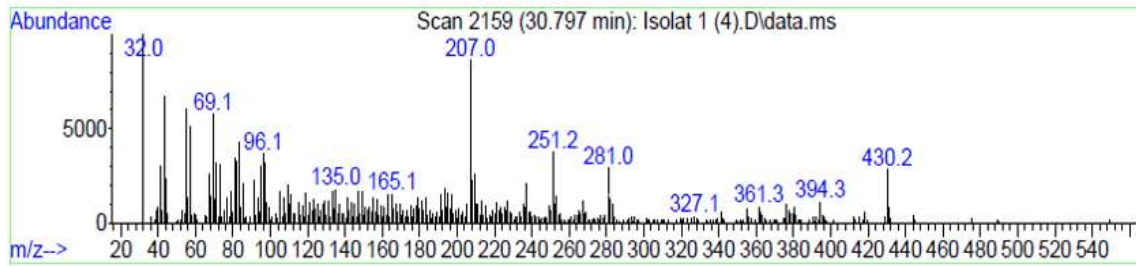
Keterangan : (A) Isolat 1, (B) Isolat 2, (C) Isolat 3, (K) Klindamisin

**Lampiran 20. Uji Aktivitas KBM Isolat pada *S.epidermidis* (Eksperimen 2)**

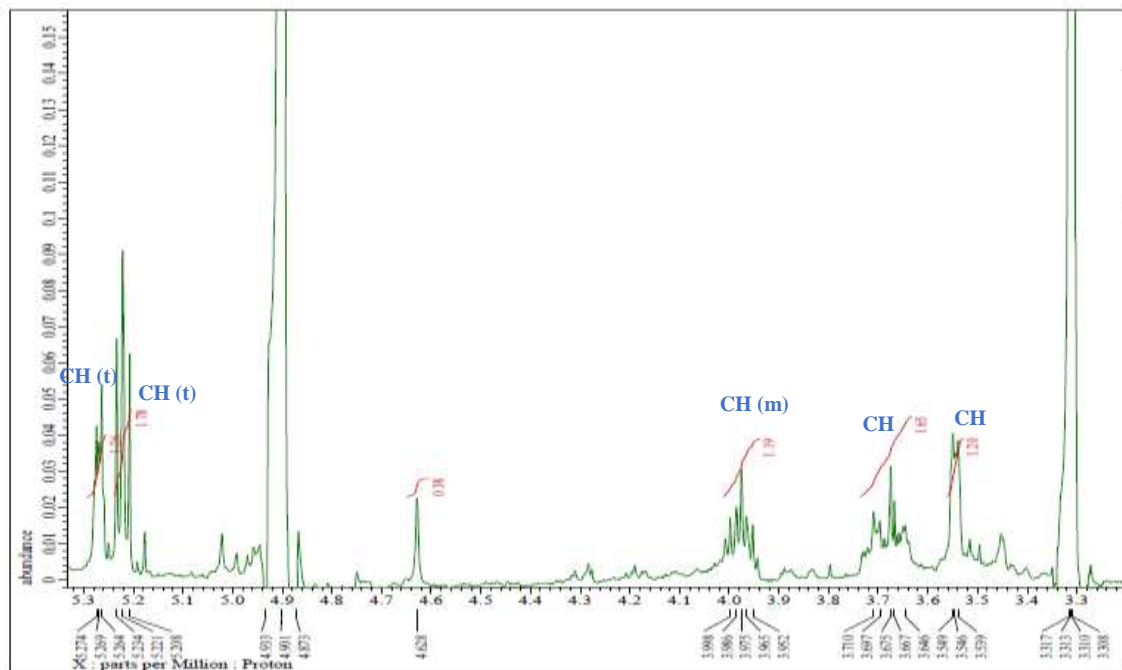
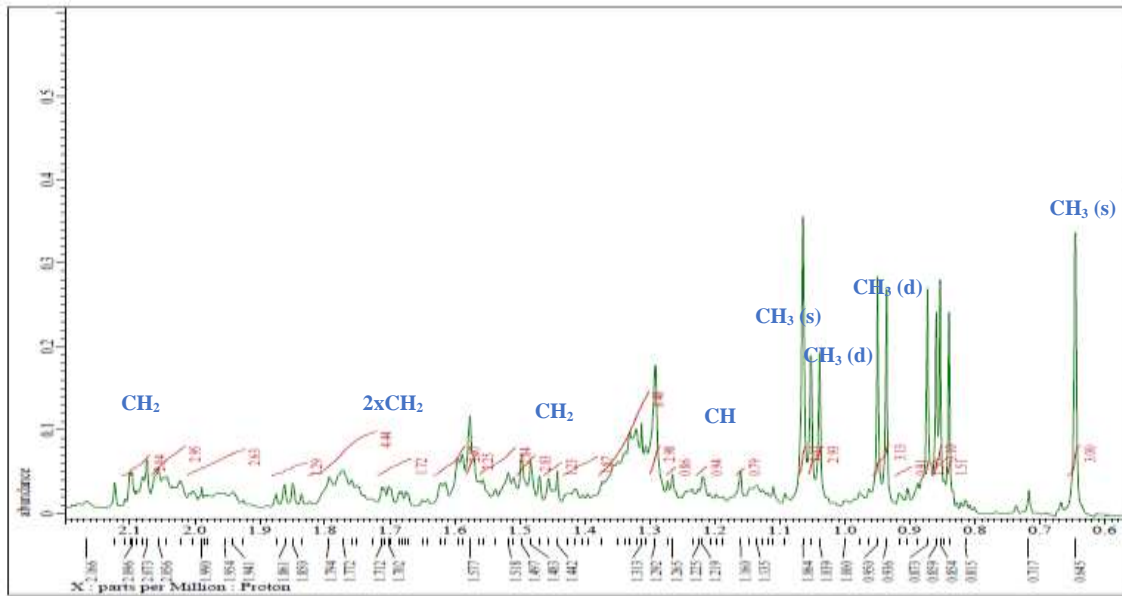


Keterangan : (A) Isolat 1, (B) Isolat 2, (C) Isolat 3, (K) Klindamisin

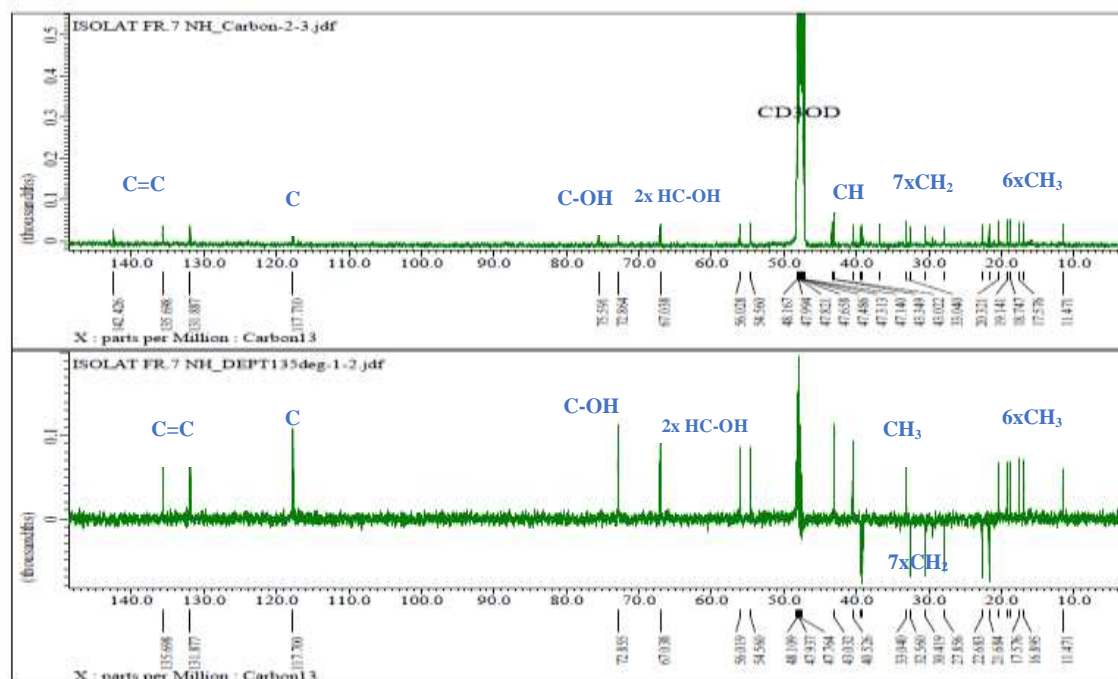
**Lampiran 21. Hasil Spektrum IR Senyawa Isolat 1**

**Lampiran 22. Hasil Spektrum GC-MS Senyawa Isolat 1**

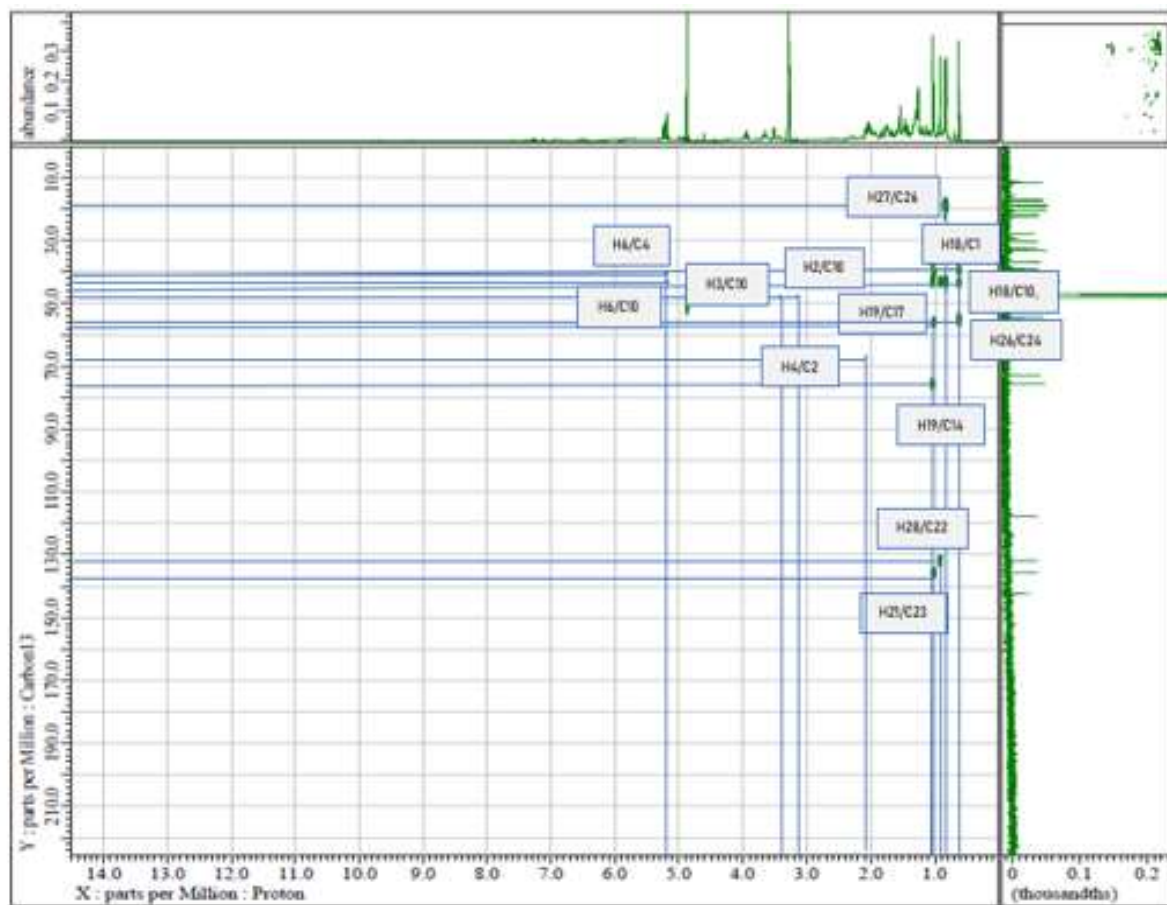
### Lampiran 23. Hasil Spektrum H NMR Senyawa Isolat 1



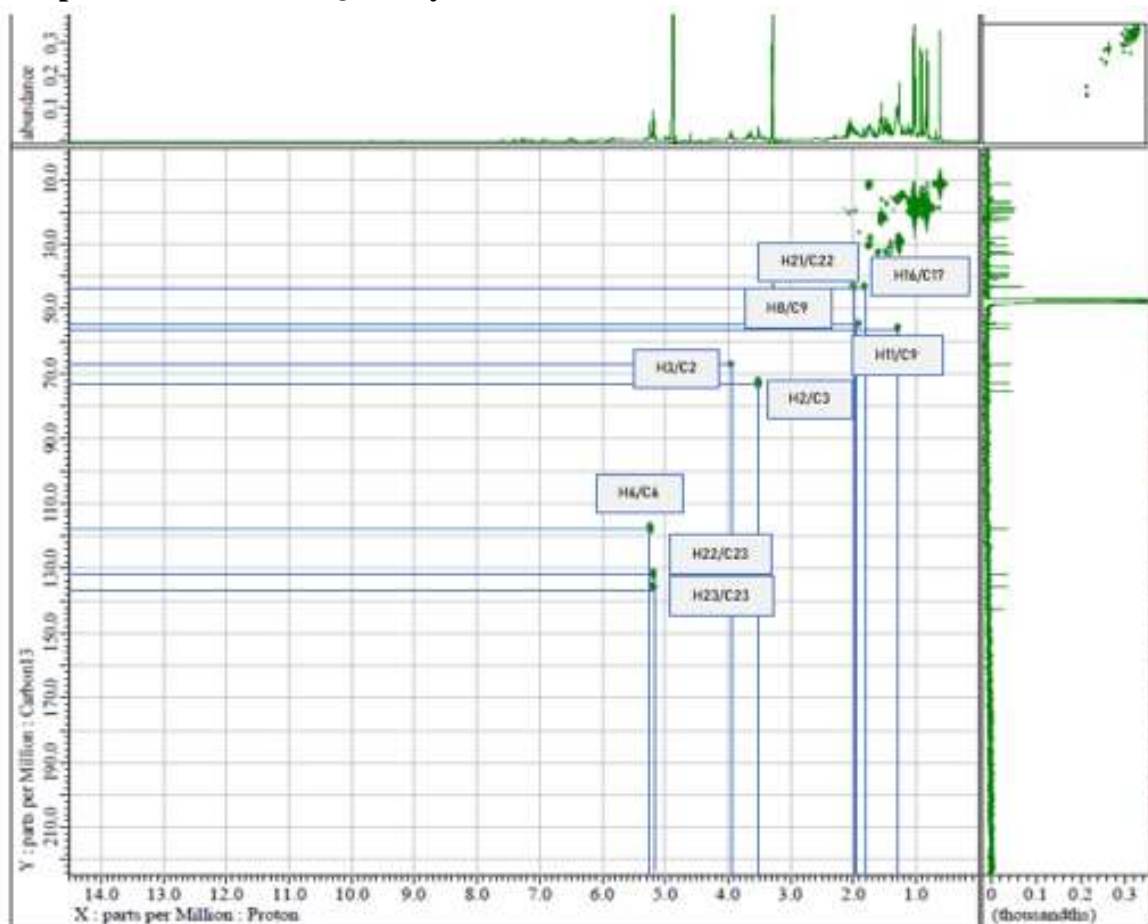
## Lampiran 24. Hasil Spektrum C NMR dan DEPT 135 Senyawa Isolat 1



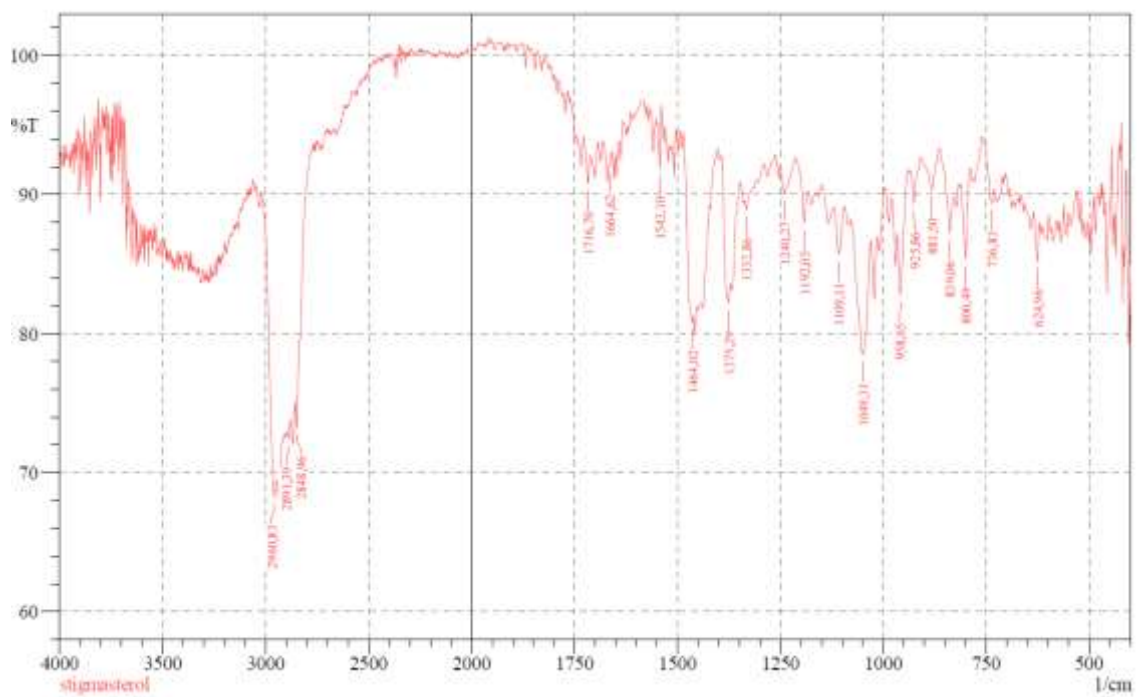
## Lampiran 25. Hasil HMBC Senyawa Isolat 1

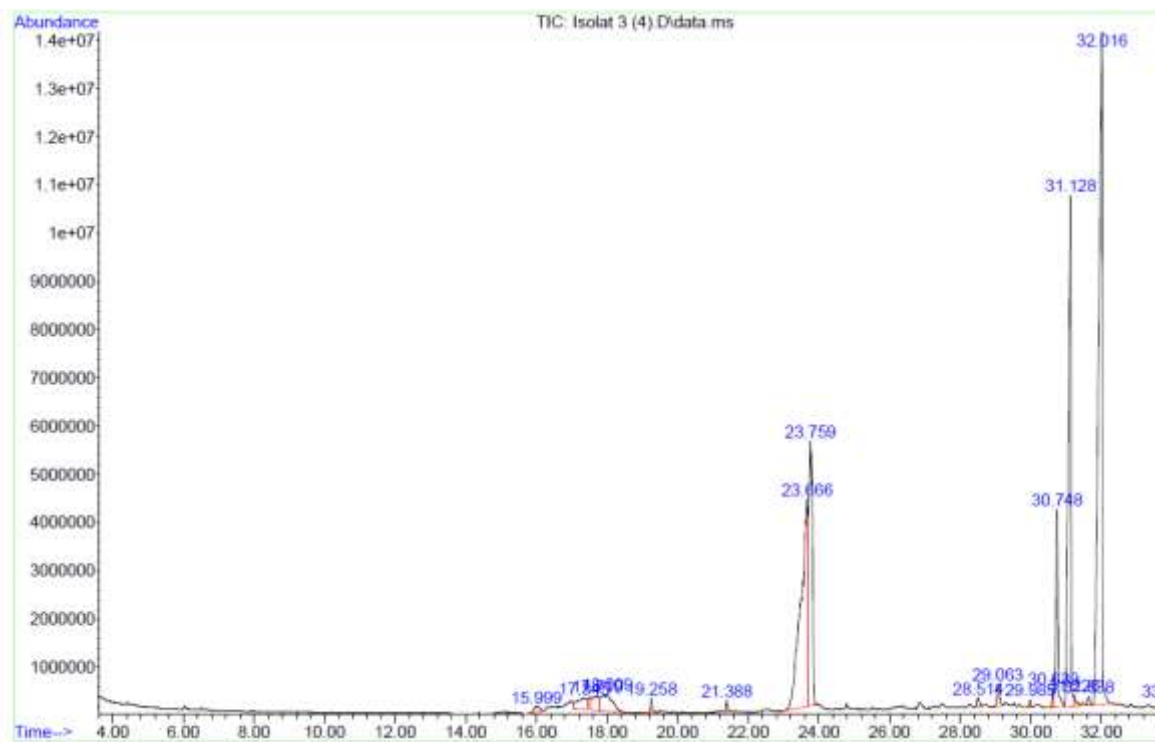
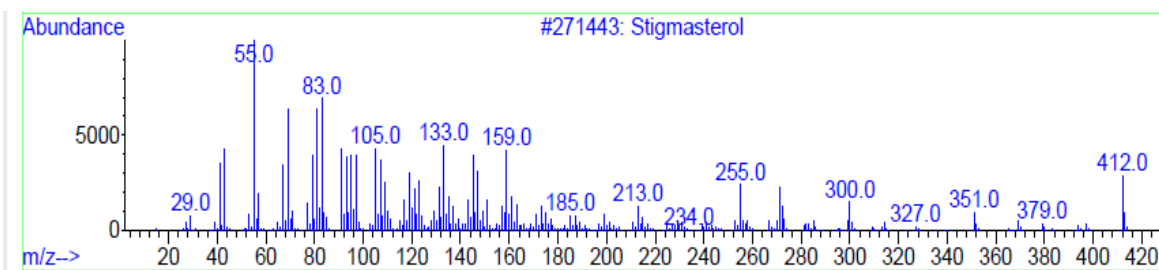


## Lampiran 26. Hasil HMQC Senyawa Isolat 1

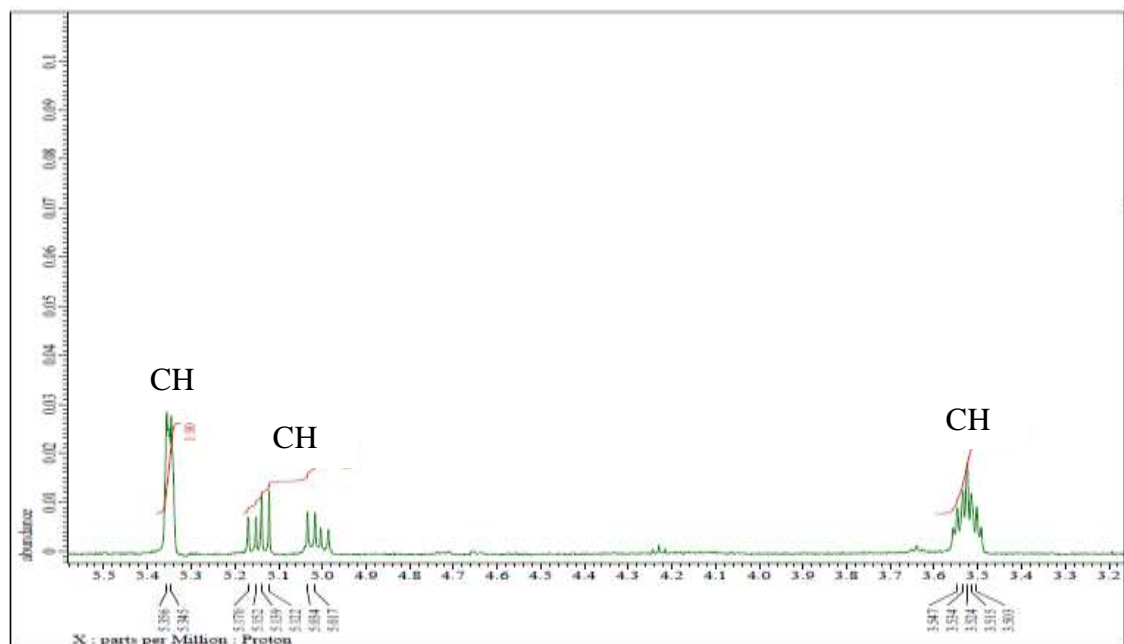
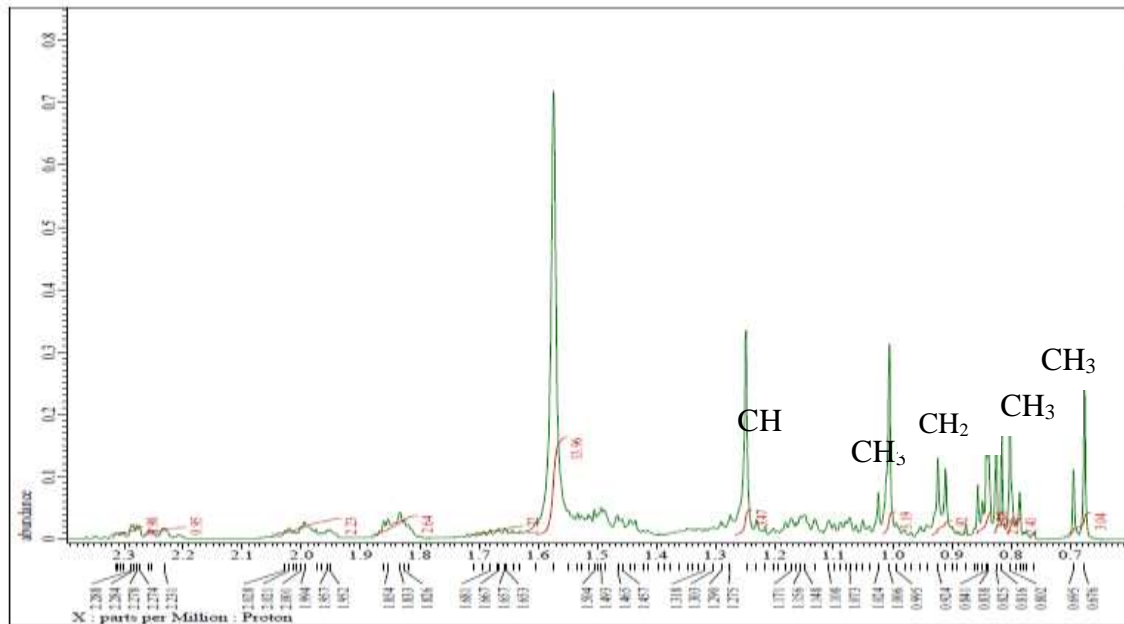


## Lampiran 27. Hasil Spektrum IR Senyawa Isolat 3



**Lampiran 28. Hasil Spektrum GC-MS Senyawa Isolat 3**

## Lampiran 29. Hasil Spektrum H NMR Senyawa Isolat 3



## Lampiran 30. Hasil Spektrum C NMR dan DEPT 135 Senyawa Isolat 3

