

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK KLOOROFORM  
KELOPAK ROSELLA (*Hibiscus sabdariffa* Linn) TERHADAP  
*Propionibacterium acne*, *Escherichia coli*, DAN  
*Staphylococcus aureus* SERTA UJI BIOAUTOGRAFI**

**SKRIPSI**



Oleh:

**ALIF BAGAS WAHYU PUTRA  
K 100 060 205**

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SURAKARTA  
SURAKARTA  
2010**

## **BAB I**

### **PENDAHULUAN**

#### **A. Latar Belakang Masalah**

Penyakit infeksi merupakan salah satu permasalahan dalam bidang kesehatan yang dari waktu ke waktu terus berkembang. Infeksi merupakan penyakit yang dapat ditularkan dari satu orang ke orang lain atau dari hewan ke manusia. Infeksi dapat disebabkan oleh berbagai mikroorganisme seperti virus, bakteri, jamur, riketsia, dan protozoa. Organisme-organisme tersebut dapat menyerang seluruh tubuh manusia atau sebagian daripadanya (Gibson, 1996).

Infeksi dapat disebabkan oleh bakteri, contoh beberapa bakteri yang dapat menyebabkan infeksi diantaranya *P. acne*, *S. aureus*, dan *E. coli* (Gibson, 1996). Infeksi *E. coli* yang patogen pada manusia yaitu yang bersifat verotoksigenik (Trihendrokesowo, 1989). Infeksi *Staphylococcus aureus* dapat menghemolisis darah dan mengkoagulasi plasma, supurasi, pembentukan abses, infeksi piogenik, sampai septikimia yang fatal. Bakteri ini cepat menjadi resisten terhadap banyak zat antijasad renik dan menyebabkan masalah pengobatan yang sulit (Jawetz *et al.*, 1991). Infeksi *E. coli* dapat menyebabkan infeksi saluran kencing yang merupakan infeksi terbanyak (80%) gastroenteritis, dan meningitis pada bayi, peritonitis, infeksi lokal, kolesistitis, syok bakterimia karena masuknya organisme ke dalam darah dari uretra, kateterisasi atau sistokopi, atau dari daerah sepsis pada abdomen atau pelvis (Gibson, 1996).

Jerawat (*acne vulgaris*) merupakan penyakit kulit yang menyerang pilosebacea kulit yaitu bagian kelenjar sebacea dan folikel rambut. Pembentukan

jerawat terjadi karena adanya penyumbatan folikel oleh sel-sel kulit mati, sebum, dan peradangan yang disebabkan oleh *Propionibacterium acne* pada folikel sebacea (West *et al.*, 2005). Pengobatan jerawat dilakukan dengan cara memperbaiki abnormalitas folikel, menurunkan produksi sebum, menurunkan jumlah koloni *Propionibacterium acne*, dan menurunkan inflamasi pada kulit. Populasi bakteri *Propionibacterium acne* dapat diturunkan dengan memberikan suatu zat antibakteri seperti eritromisin, klindamisin, dan benzoil peroksida (Wyatt *et al.*, 2001).

Pengobatan infeksi yang paling umum dilakukan adalah dengan terapi antibiotik. Antibiotik adalah suatu substansi kimia yang diperoleh atau dibentuk dan dihasilkan oleh mikroorganisme. Zat atau substansi tersebut dalam jumlah yang sedikitpun masih mempunyai daya hambat terhadap kegiatan mikroorganisme lainnya (Waluyo, 2004).

Timbulnya strain bakteri yang resisten terhadap antibiotik pada penyakit infeksi merupakan masalah penting. Kekebalan bakteri terhadap antibiotik menyebabkan angka kematian semakin meningkat, sedangkan penurunan infeksi oleh bakteri-bakteri patogen dapat menyebabkan kematian sulit dicapai. Selain itu cara pengobatan dengan menggunakan kombinasi berbagai antibiotik juga dapat menimbulkan masalah resisten (Jawetz, 1991).

Berdasarkan pengalaman empiris turun-temurun banyak sekali jenis tanaman obat di Indonesia yang dapat dimanfaatkan untuk pemeliharaan kesehatan. Bahkan ada yang terbukti berkhasiat untuk pengobatan jenis penyakit tertentu (Anonim, 1998). *Hibiscus sabdariffa* Linn (rosella) merupakan salah satu

tanaman yang dapat dimanfaatkan sebagai obat tradisional. Salah satu kandungan yang terdapat dalam tanaman ini adalah glikosida jantung, flavonoid, saponin, dan alkaloid. Salah satu fungsi dari flavonoid dan saponin adalah kerjanya sebagai antibakteri. Zat-zat tersebut merupakan senyawa aktif dalam tanaman yang berkhasiat sebagai obat yang dapat menyembuhkan penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri. Kelopak rosella memperlihatkan aktivitas antibakteri dengan *minimum inhibitory concentration* (MIC)  $0,30 \pm 0,2$ - $1,30 \pm 0,2$  mg/ml terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* (Olaleye, 2007).

Oleh karena itu penelitian ini dimaksudkan untuk menguji aktivitas antibakteri ekstrak kloroform kelopak rosella terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Propionibacterium acne* yang merupakan bakteri Gram positif dan *Escherichia coli* yang merupakan bakteri Gram negatif dengan metode dilusi padat. Pemeriksaan profil kromatografi lapis tipis secara kualitatif dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa kimia dari ekstrak kloroform kelopak rosella dan metode bioautografi digunakan untuk mendeteksi senyawa aktif yang mempunyai aktivitas sebagai antibakteri. Untuk mengetahui kandungan senyawa aktif yang bertanggung jawab sebagai antibakteri, kelopak rosella dapat disari dengan berbagai pelarut. Maserasi bertingkat berfungsi untuk mengetahui kemampuan masing-masing pelarut dalam mengambil sari dari tanaman obat dan untuk mengetahui seberapa besar daya hambat dari masing-masing penyari terhadap bakteri uji.

## B. Perumusan Masalah

1. Apakah ekstrak kloroform kelopak rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn) memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Propionibacterium acne*, *E. coli*, dan *S. aureus* ?
2. Senyawa kimia apa saja yang terkandung di dalam ekstrak kloroform kelopak rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn) yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri?

## C. Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang tersebut, tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Menentukan aktivitas antibakteri ekstrak kloroform kelopak rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn) terhadap *P. acne*, *E. coli* dan *S. aureus* dengan metode dilusi padat.
2. Menentukan senyawa kimia yang terkandung di dalam ekstrak kloroform kelopak rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn) yang mempunyai aktivitas antibakteri dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT) dan uji bioautografi.

## D. Tinjauan Pustaka

### 1. Tanaman rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn)

#### a. Sistematika tanaman

Menurut sistematikanya tanaman rosella adalah sebagai berikut :

Divisi : Spermatophyta

Sub Divisi : Angiospermae

Kelas : Dicotyledoneae  
Bangsa : Malvales  
Suku : Malvaceae  
Marga : Hibiscus  
Jenis : *Hibiscus sabdariffa* Linn (Widyanto dan Anne, 2000).

b. Kandungan kimia rosella

Berbagai kandungan yang terdapat dalam tanaman rosella membuatnya populer sebagai tanaman obat tradisional. Selain mengandung vitamin C, kelopak rosella mengandung flavonoid, gossypetin, glukosida hibiscin, fosfor, besi, asam organik, asam amino, essensial (lisin dan arginin), polisakarida, dan omega-3 (Widyanto dan Anne, 2000).

c. Khasiat kelopak rosella

Kelopak bunga, daun, dan bijinya berkhasiat untuk melancarkan air seni, antisariawan, dan pereda nyeri. Kelopak bunga rosella mempunyai efek farmakologis yang cukup lengkap, seperti diuretik, atelmintik, antibakteri, antiseptik, antiradang, menurunkan panas, mencegah gangguan jantung, kanker darah, dan menstimuli gerak peristaltik usus. Daunnya dapat mengobati pematangan bisul dan melembutkan kulit (Widyanto dan Anne, 2000).

## 2. Metode Ekstraksi

Ekstraksi adalah penarikan zat aktif yang diinginkan dari bahan mentah obat dengan menggunakan pelarut yang dipilih sehingga zat yang diinginkan akan larut (Ansel, 1989).

Ada beberapa metode dasar ekstraksi yang dipakai untuk penyarian diantaranya yaitu maserasi, perkolasi, dan sokletasi. Penelitian terhadap metode tersebut disesuaikan dengan kepentingan dalam memperoleh sari yang baik (Anonim, 1986).

a. Maserasi

Maserasi merupakan proses penyarian yang sederhana dan paling banyak digunakan untuk bahan obat yang berupa serbuk simplisia yang halus, direndam dalam penyari, sampai meresap dan melunakkan susunan sel sehingga zat-zat akan terlarut. Serbuk simplisia yang akan disari ditempatkan dalam wadah atau bejana yang terlindung dari cahaya langsung (untuk mencegah terjadinya reaksi yang dikatalisis cahaya atau perubahan warna), ditutup rapat kemudian dikocok berulang-ulang sehingga memungkinkan pelarut masuk ke seluruh permukaan simplisia, rendaman harus dikocok berulang-ulang (Ansel, 1989). Hasil penyarian dengan maserasi perlu dibiarkan selama waktu tertentu. Waktu tersebut diperlukan untuk mengendapkan zat-zat yang tidak diperlukan tetapi ikut terlarut dalam cairan penyari. Hasil ekstraksi disimpan dalam kondisi dingin selama beberapa hari, kemudian cairannya dituang dan disaring (Voigt, 1984).

Keuntungan penyarian dengan menggunakan maserasi adalah senyawa yang bersifat labil oleh panas tidak menjadi rusak atau hilang, cara pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana dan mudah diusahakan. Kerugiannya adalah menggunakan cairan penyari yang relatif banyak dan harus sering digojok agar proses penyarian berlangsung sempurna (Anonim, 1986).

#### b. Perkolasi

Perkolasi adalah suatu penarikan, memakai alat yang disebut perkolator, yang simplisianya terendam dalam cairan penyari dimana zat-zatnya terlarut dan larutan tersebut akan menetes secara baraturan keluar sampai memenuhi syarat-syarat yang telah ditetapkan. Pada proses penarikan ini, cairan penyari akan turun perlahan-lahan dari atas melalui simplisia. Bahan pengestraksi yang dialirkan secara berkelanjutan dari atas, akan mengalir turun secara lambat melintasi simplisia yang umumnya berupa serbuk kasar (Voigt, 1984).

#### c. Sokhletasi

Sokhletasi merupakan salah satu metode yang dapat digunakan dalam penyarian untuk mendapatkan ekstrak, pada proses ini sampel yang dicari dimasukkan pada alat penyari soxhlet, kemudian dielusi dengan pelarut yang cocok. Adanya pemanasan menyebabkan pelarut menguap ke atas, kemudian pendingin udara akan mengembunkan menjadi tetesan yang akan terkumpul kembali dan bila melewati batas lubang pipa samping soxhlet akan terjadi sirkulasi. Sirkulasi yang berulang akan menghasilkan penyarian yang baik (Harborne, 1987).

### **3. Bakteri**

Bakteri hidup tersebar di alam, antara lain di tanah, udara, air dan makanan. Secara garis besar bakteri dapat dibedakan menjadi bakteri gram positif dan bakteri gram negatif. Bakteri gram positif yaitu bakteri yang pada pengecatan gram tetap mengikat warna cat pertama (Gram A) karena tahan terhadap alkohol



dan tidak mengikat warna cat yang kedua (warna kontras) sehingga bakteri akan berwarna ungu. Bakteri gram negatif yaitu bakteri yang pada pengecatan gram warna cat pertama (Gram A) dilunturkan karena tidak tahan terhadap alkohol dan mengikat warna cat yang kedua (warna kontras) sehingga bakteri berwarna merah (Pelczar dan Chan, 1986).

Bakteri Gram positif mempunyai dinding sel yang tebal (15-80 nm) dan terdiri dari lapisan peptidoglikan 40-50%, lipid 2%, asam teikoat. Dinding sel bakteri Gram negatif sangat tipis (10-15 nm) yang terdiri dari lapisan peptidoglikan 5-20%, lipid 20%, protein, lipopolisakarida dan lipoprotein (Suryono, 1995).

#### 1) *Staphylococcus aureus*

Klasifikasi *Staphylococcus aureus*

Divisi : Protophyta

Kelas : Schizomycetes

Bangsa : Eubacteriales

Suku : Micrococcaceae

Marga : Staphylococcus

Jenis : *Staphylococcus aureus* (Salle, 1961)

*S. aureus* termasuk bakteri Gram positif, berbentuk bulat, berdiameter 0,1-1,5  $\mu\text{m}$ . terdapat tunggal berpasangan dan secara khas membelah diri pada lebih dari satu bidang sehingga membentuk gerombol yang tidak teratur (Pelzhar, 1988). *Staphylococcus aureus* adalah patogen utama pada manusia. *Staphylococcus aureus* bersifat koagulatif positif yang membedakan dari

spesies lain. Hampir setiap orang pernah mengalami berbagai infeksi *Staphylococcus aureus* selama hidupnya, dari keracunan makanan yang berat atau infeksi kulit yang kecil, sampai infeksi yang tidak bisa disembuhkan (Jawetz *et al.*, 2001).

## 2) *Escherichia coli*

*E. coli* merupakan bakteri Gram negatif, berbentuk batang lurus, berukuran panjang 1-3  $\mu\text{m}$ , dan lebar 0,4-0,7  $\mu\text{m}$ , bergerak dengan flagel peritrik atau tidak dapat bergerak, dan merupakan kuman perut pada bagian flora normal saluran usus dan bersifat patogen oportunis (Bonang dan Koeswardono, 1982).

*E. coli* mempunyai sifat yang unik karena dapat menyebabkan infeksi primer pada usus misalnya diare pada anak-anak dan *traveler's diarrhea*, seperti juga kemampuannya menimbulkan infeksi pada jaringan tubuh lain diluar usus (Karsinah dkk., 1994).

Klasifikasi dari *Escherichia coli* sebagai berikut :

Divisi	: Protophyta	
Kelas	: Schizomycetes	
Bangsa	: Eubacteriales	
Suku	: Enterobacteriaceae	
Marga	: Escherichia	
Jenis	: <i>Escherichia coli</i>	(Salle, 1961)

*E. coli* berbentuk batang gemuk berukuran 2,4  $\mu\text{m}$  x 0,4  $\mu\text{m}$  sampai 0,7  $\mu\text{m}$ , termasuk Gram negatif tidak bersimpai, bergerak aktif dan tidak berspora.

Bersifat aerob atau fakultatif aerob dan tumbuh pada pembenihan biasa. Suhu optimum pertumbuhannya yaitu 37° C. *E. coli* meragi laktosa, glukosa, sukrosa, maltosa dan manitol dengan asam dan gas. Pada uji indol dan uji merah metil menunjukkan hasil positif (+), sedangkan pada uji Proskauer dan uji sitrat menunjukkan hasil negatif (-). *E. coli* tidak menghidrolisis urea dan tidak membentuk H<sub>2</sub>S (Gupte, 1990).

Dinding sel bakteri Gram negatif merupakan struktur yang berlapis-lapis dan sangat kompleks. Komponen khusus dinding sel merupakan selaput ganda fosfolipid ini diganti dengan molekul polisakarida. Bakteri *E. coli* pada umumnya tidak menyebabkan penyakit bila masih berada dalam usus, tetapi dapat menyebabkan penyakit pada saluran kencing, paru-paru, saluran empedu, peritonium, dan saluran otak bila mencapai jaringan di luar saluran pencernaan, pada keadaan yang kurang baik seperti prematur, usia tua, terserang penyakit lain, setelah imunisasi, bakteri ini dapat mencapai saluran darah dan akan terjadi sepsis (Jawetz *et al.*, 1986).

*E. coli* dapat menyebabkan infeksi pada traktus urinarius juga dapat menyebabkan meningitis pada bayi prematur dan neonatal. Strain entero patogenik *E. coli* sering menyebabkan diare akut pada anak-anak di bawah umur 2 tahun (Salle, 1961). *E. coli* tumbuh baik pada hampir semua media yang biasa dipakai di laboratorium mikrobiologi. Pada media yang dipergunakan untuk isolasi kuman enterik, sebagian besar strain *E. coli* tumbuh sebagai koloni yang meragi laktosa. *E. coli* bersifat mikroaerofilik. Beberapa

strain bila ditanam pada agar darah menunjukkan hemolisis tipe  $\beta$  (Anonim, 1996).

Penyakit-penyakit yang disebabkan oleh *E. coli* adalah :

- a. Diare
- b. Infeksi saluran kemih mulai dari sistitis sampai pielonefritis
- c. Pneumonia
- d. Meningitis pada bayi baru lahir
- e. Infeksi luka terutama luka di dalam abdomen (Anonim, 1994)

Pada lempeng agar koloni berbentuk bulat, diameternya 1-2 mm, cembung, buram, mengkilat, dan konsistensinya lunak. Warna khasnya ialah kuning, keemasan, intensitas warnanya dapat bervariasi pada lempeng agar darah umumnya koloni lebih besar dan pada varietas tertentu koloninya dikelilingi oleh zona hemolisis (Warsa, 1994).

### 3) *Propionibacterium acne*

Klasifikasi *Propionibacterium acne* :

Kingdom	: Bacteria	
Phylum	: Actinobacteria	
Class	: Actinobacteridae	
Ordo	: Actinomycetales	
Familia	: Propionibacteriaceae	
Genus	: Propionibacterium	
Spesies	: <i>Propionibacterium acne</i>	(Salle, 1961)

*P. acne* adalah merupakan bakteri penyebab jerawat yang terjadi ketika lubang kecil pada permukaan kulit yang disebut pori-pori tersumbat. Pori pori merupakan lubang bagi saluran yang disebut folikel, yang mengandung rambut dan kelenjar minyak. Biasanya, kelenjar minyak membantu menjaga kelembaban kulit dan mengangkat sel kulit mati. Ketika kelenjar minyak memproduksi terlalu banyak minyak, pori-pori akan banyak menimbun kotoran dan juga mengandung bakteri (Anonim, 2007).

Mekanisme terjadinya jerawat adalah bakteri *P. acne* merusak stratum korneum dan stratum germinat dengan cara menyekresikan bahan kimia yang menghancurkan dinding pori. Kondisi ini dapat menyebabkan inflamasi. Asam lemak dan minyak kulit tersumbat dan mengeras. Jika jerawat disentuh maka inflamasi akan meluas sehingga padatan asam lemak dan minyak kulit yang mengeras akan membesar (Anonim, 2007).

#### **4. Antibakteri**

Antibakteri adalah obat atau senyawa kimia yang mampu membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri khususnya bakteri yang merugikan manusia. Berdasarkan sifat toksisitas selektif, ada antimikroba yang bersifat menghambat pertumbuhan mikroba, dikenal sebagai aktivitas bakteriostatik, dan ada yang bersifat membunuh mikroba, dikenal sebagai aktivitas bakterisid. Kadar minimal yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan mikroba atau membunuhnya, masing-masing dikenal sebagai Kadar Hambat Minimal (KHM) dan Kadar Bunuh Minimal (KBM) (Anonim, 1995). Antibakteri tertentu aktivitasnya dapat meningkat menjadi bakterisid bila kadar antibakterinya

ditingkatkan melebihi KHM (Setiabudy dan Gan, 1995). Antimikroba umumnya dinyatakan sebagai penghambatan pertumbuhan mikroorganisme, dan apabila dimaksudkan untuk kelompok organisme maka sering digunakan istilah antibakteri untuk bakteri atau antifungi untuk jamur (Pelzar dan Chan, 1988). Adapun faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas antimikroba antara lain:

- 1) pH lingkungan
- 2) Komponen-komponen perbenihan
- 3) Stabilitas obat
- 4) Besarnya inokulum bakteri
- 5) Masa pengeraman
- 6) Aktivitas metabolik mikroorganisme

Mikroba adalah jasad renik tetapi tidak termasuk jenis parasit, sedangkan antibiotik adalah zat yang dihasilkan oleh suatu mikroba, terutama fungi, yang dapat menghambat atau membasmi mikroba jenis lain (Anonim, 1995). Mekanisme kerja sebagian besar obat antimikroba ataupun antibiotik dapat dibagi menjadi empat cara:

- 1) Penghambatan sintesis dinding sel
- 2) Penghambatan fungsi selaput sel
- 3) Penghambatan sintesis protein (hambatan translasi dan transkripsi bahan genetik)
- 4) Penghambatan sintesis asam nukleat (Jawetz *et al.*, 1996)

Resistensi sel mikroba ialah suatu sifat tidak terganggunya kehidupan sel mikroba oleh anti mikroba. Sifat ini merupakan suatu mekanisme alamiah untuk

bertahan hidup (Anonim, 1995). Mekanisme tersebut dapat dibagi menjadi lima macam, antara lain:

- 1) Menghasilkan enzim yang merusak obat aktif
- 2) Mengubah permeabilitasnya terhadap obat
- 3) Mengembangkan sasaran struktur yang diubah terhadap obat
- 4) Mengembangkan jalur metabolisme lain yang memintas reaksi yang dihambat oleh obat.
- 5) Membentuk suatu enzim yang telah mengalami perubahan tetapi enzim tersebut masih dapat menjalankan fungsi metabolismenya serta tidak begitu dipengaruhi oleh obat seperti enzim pada bakteri yang peka (Jawetz *et al.*, 1996).

Resistensi dibagi dalam tiga kelompok, yaitu kelompok resistensi genetik, resistensi non genetik, dan resistensi silang.

- 1) Resistensi non genetik

Bakteri dalam keadaan istirahat (inaktivitas metabolik) biasanya tidak dipengaruhi oleh antimikroba. Bila berubah menjadi aktif kembali, mikroba kembali bersifat sensitif terhadap antimikroba. Keadaan ini dikenal sebagai resistensi non genetik (Anonim, 1995).

- 2) Resistensi genetik

Terjadinya resistensi kuman terhadap antibiotik umumnya terjadi karena perubahan genetik. Perubahan genetik bisa terjadi secara kromosomal dan ekstra kromosomal.

a) Resistensi kromosomal

Ini terjadi akibat mutasi spontan pada lokus yang mengendalikan kepekaan terhadap obat antimikroba yang diberikan.

b) Resistensi ekstrakromosomal (resistensi dipindahkan)

Bakteri sering mengandung unsur-unsur genetik ekstrakromosom yang dinamakan plasmid. Bahan genetik dan plasmid tersebut dapat dipindahkan melalui mekanisme transduksi, transformasi, konjugasi, dan translokasi DNA (Jawetz *et al.*, 1996).

3) Resistensi silang

Mikroorganisme yang resisten terhadap suatu obat tertentu dapat pula resisten terhadap obat-obat lain yang memiliki mekanisme kerja yang sama (Jawetz *et al.*, 1996), atau dengan struktur kimia yang hampir sama (Anonim, 1995).

## 5. Uji aktivitas antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri dapat dilakukan dengan metode difusi (sumuran) dan metode dilusi (pengenceran). Metode dilusi atau pengenceran merupakan metode yang pengamatannya berdasarkan kekeruhan larutan. Metode ini dapat menentukan secara kuantitatif konsentrasi suatu obat yang dapat menghambat pertumbuhan kuman. Prinsip dari cara ini adalah penghambatan pertumbuhan kuman dalam pembenihan atau media cair oleh suatu obat yang dicampurkan ke dalam medium. Pembenihan yang dipakai harus merupakan pembenihan yang dapat menumbuhkan kuman secara optimum dan tidak menetralkan obat yang digunakan (Bonang dan Koeswardono, 1982).



Konsentrasi hambat minimum (KHM) dan konsentrasi bunuh minimum (KBM) dapat ditentukan dalam metode dilusi. KHM ditentukan dengan mengamati adanya kekeruhan pada seri pengenceran dari sejumlah tabung yang telah diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 24 jam dan diamati ada tidaknya pertumbuhan bakteri (Soemarsono, 1987).

Metode dilusi atau pengenceran tabung mempunyai beberapa kelebihan dan kekurangan. Kelebihan metode dilusi diantaranya adalah hasil yang diperoleh lebih teliti, KHM dapat ditentukan sekaligus, juga lebih mudah dan praktis. Kekurangan metode dilusi yaitu sampel yang digunakan untuk percobaan harus jernih karena jika keruh akan mempersulit pengamatan (Soemarsono, 1987).

## **6. Kromatografi Lapis tipis**

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) adalah metode pemisahan fisika kimia. Lapisan yang dipisahkan terdiri atas bahan struktur-struktur (fase diam), diletakkan pada penyangga berupa plat gelas, logam, lapisan yang cocok. Campuran yang akan dipisahkan berupa larutan, ditotolkan berupa bercak. Setelah pekat, lapisan diletakkan di dalam bejana tertutup rapat yang berisi larutan pengembang yang cocok (fase gerak), pemisahan terjadi selama perambatan kapiler (pengembangan). Selanjutnya senyawa yang tidak berwarna harus ditampakkan (dideteksi) (Stahl, 1985).

Fase diam berupa serbuk halus, dalam Kromatografi Lapis Tipis (KLT) bahan penjerap yang umumnya adalah silika Gel, aluminium oksida, selulosa dan turunannya serta poliamida. Silika Gel bekas banyak digunakan dan dipakai untuk campuran senyawa lipofil maupun senyawa hidrofil (Hostettmam *et al.*, 1995).

Pemisahan fase gerak baik tunggal maupun campuran tergantung solut yang dianalisis dan fase diam yang digunakan. Bila fase diam telah ditentukan maka memilih fase gerak dapat berpedoman pada kekuatan elusi fase gerak tersebut (Sumarno, 2001).

Pada Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dikenal istilah atau pengertian faktor *Retardation factor* (Rf) untuk tiap-tiap noda kromatografi yang dirumuskan sebagai berikut:

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh solut (cm)}}{\text{Jarak yang ditempuh fase gerak (cm)}} \quad (\text{Stahl, 1994}).$$

Angka Rf berjangka antara 0,00 dan 1,00 dan hanya dapat ditentukan 2 desimal. hrf ialah angka Rf dikalikan faktor 100 (h), menghasilkan nilai berjangka 0 sampai 100 (Stahl, 1994).

## **7. Bioautografi**

Bioautografi merupakan metode spesifik untuk mendeteksi bercak pada kromatogram hasil KLT yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri, antifungi, dan antiviral. Bioautografi dapat juga digunakan untuk mendeteksi antibiotik yang belum diketahui karena metode kimia atau fisika hanya terbatas untuk senyawa murni (Zweig dan Whittaker, 1971).

Dalam prakteknya, kromatogram diletakkan pada permukaan agar didalam petri yang telah diinokulasi dengan mikroorganisme. Setelah zat dalam kromatogram berdifusi ke agar, lempeng diangkat dan agar diinkubasi. Setelah

masa inkubasi berakhir, dapat diamati bercak yang menyebabkan hambatan pertumbuhan mikrobia uji, kemudian dicocokkan dengan hasil deteksi kromatogramnya dengan metode deteksi KLT yang sesuai (Zweig dan Whittaker, 1971).

### **E. Landasan Teori**

Olaleye (2007) telah melakukan uji antibakteri ekstrak metanol terhadap kelopak rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn) yaitu dengan metode *disc-diffusion*. Pada penelitian ini menunjukkan hasil bahwa kelopak rosella terbukti mempunyai aktivitas bakteri. Senyawa-senyawa seperti flavonoid, saponin, glikosida jantung, dan alkaloid merupakan beberapa kandungan yang terdapat didalam tanaman rosella. Zat-zat tersebut memberikan aktivitas sebagai antibakteri dengan *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) sebesar  $0,30 \pm 0,2 - 1,30 \pm 0,2$  mg/ml yaitu pada bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

Pada penelitian yang lain, Borisutpeth *et al.*, 2005 juga menjelaskan bahwa dengan metode *colorimetric micro-dilution* ekstrak air dan alkohol rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn) juga mempunyai aktivitas antibakteri, dengan metode ini didapatkan potensi dengan *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) sebesar 4,7 mg/ml dan *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC) sebesar 4,7 mg/ml terhadap *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus agalactiae*.

Penelitian Kanbutra *et al.*, 2003 menunjukkan aktivitas antibakteri *H. sabdariffa* terhadap *E. coli* F18+ yang diisolasi mempunyai potensi tinggi dengan

*Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) sebesar 4,7 mg/ml dan *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC) sebesar 9,4 mg/ml.

Telah dilakukan penelitian yang hampir sama dengan penelitian Borisutpeth *et al.*, 2005 yaitu dengan menggunakan ekstrak air dan etanol *Hibiscus sabdariffa* Linn dan hasil yang didapatkan mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas stutzeri*, dan *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* paling tinggi dibanding *medical plants* yang lain (*Cissampelos adnata*, *Cuminum cyminum*, *Oxalis corniculata*, *Piper longum* dan *Tamarindus indica*) dengan metode *disc-diffusion*. Pada penelitian ini *H. sabdariffa* memperlihatkan aktivitas antibakteri paling tinggi adalah *Escherichia coli* dibanding *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas stutzeri* and *Klebsiella pneumonia* (Laikangbam *et al.*, 2009)

### **E. Hipotesis**

Ekstrak kloroform kelopak rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn) memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Propionibacterium acne*, *Escherichia coli*, dan *Staphylococcus aureus*.

Glikosida jantung, flavanoid, saponin, dan alkaloid merupakan senyawa kimia yang terkandung di dalam ekstrak kloroform kelopak reosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn) yang mempunyai aktivitas sebagai antibakteri.