

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL DAUN
SIRIH (*Piper betle* L.) TERHADAP *Propionibacterium acne* DAN
Staphylococcus aureus MULTIRESISTEN**

SKRIPSI



Oleh:

**ZENDA FADILA PUTRI
K 100 060 127**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SURAKARTA
SURAKARTA
2010**

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Penyakit infeksi merupakan salah satu masalah 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. Penyakit infeksi dapat disebabkan oleh empat kelompok besar hama penyakit, yaitu: bakteri, jamur, virus dan parasit (Jawetz *et al.*, 2001).

Pemanfaatan bahan alam sebagai obat tradisional di Indonesia akhir-akhir ini meningkat, bahkan beberapa bahan alam telah diproduksi secara fabrikasi dalam skala besar. Penggunaan obat tradisional dinilai memiliki efek samping yang lebih kecil dibandingkan dengan obat yang berasal dari bahan kimia, di samping itu harganya lebih terjangkau (Tampubolon, 1981).

Keuntungan lain penggunaan obat tradisional adalah bahan bakunya mudah diperoleh dan harganya yang relatif murah. Delapan puluh persen penduduk Indonesia hidup di pedesaan dan kadang sulit dijangkau oleh tim medis dan obat-obat modern (Poedjarwoto dkk., 1992). Mahalnya biaya pengobatan modern menyebabkan masyarakat kebanyakan berpaling ke obat tradisional yang berasal dari alam. Selain keuntungan tersebut di atas, obat tradisional terdapat dalam jumlah yang banyak di Indonesia. Selanjutnya senyawa aktif yang terkandung di dalam obat tradisional dapat dijadikan sebagai senyawa penuntun (Sardjoko, 1993).

Salah satu tanaman yang dapat dimanfaatkan sebagai obat adalah tumbuhan *Piper betle* yang dikenal dengan sirih. Masyarakat memanfaatkan tumbuhan ini untuk tujuan pengobatan pada hidung berdarah (mimisen-Jawa), mulut berbau, mata sakit, radang tenggorokan (Sudarsono dkk., 1996). Selain itu sirih juga berkhasiat sebagai antisariawan, antibatuk, *astringent*, dan antiseptik (Anonim, 1980). Kandungan kimia tumbuhan sirih adalah saponin, flavonoid, polifenol, dan minyak atsiri (Anonim, 2000).

Senyawa saponin dapat bekerja sebagai antimikroba (Robinson, 1995). Senyawa saponin akan merusak membran sitoplasma dan membunuh sel (Assani, 1994). Senyawa flavonoid diduga mekanisme kerjanya mendenaturasi protein sel bakteri dan merusak membran sel tanpa dapat diperbaiki lagi (Pelczar dan Chan, 1988).

Hermawan (2007) mengemukakan bahwa ekstrak etanol daun sirih memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* pada KHM (Kadar Hambat Minimum) 2,5% dengan metode difusi disk. Savaspun (2000) mengemukakan bahwa ekstrak etanol daun sirih menunjukkan lebih poten aktivitas antibakteri dan antifunginya daripada ekstrak petroleum eter. Arambewela dkk (2004) mengemukakan bahwa ekstrak etanol daun sirih menunjukkan aktivitas tinggi terhadap *Staphylococcus aureus* dengan MIC 5×10^3 µg/mL dengan metode difusi disk. Sukmaningtyas (2007) mengemukakan bahwa ekstrak etanol daun sirih memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus epidermis* penyebab jerawat pada KBM (Kadar Bunuh Minimum) 3,125% v/v. Oleh karena itu penelitian ini dimaksudkan untuk menguji aktivitas

antibakteri dari ekstrak etanol daun sirih terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* multiresisten dan *Propionibacterium acne*.

B. Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang dirumuskan beberapa masalah sebagai berikut:

1. Apakah ekstrak etanol daun sirih (*Piper betle* L.) memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Propionibacterium acne* dan *Staphylococcus aureus* multiresisten?
2. Golongan senyawa apa yang terkandung dalam ekstrak etanol daun sirih yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Propionibacterium acne* dan *Staphylococcus aureus* multiresisten?

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk:

1. Menentukan aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun sirih terhadap *Propionibacterium acne* dan *Staphylococcus aureus* multiresisten.
2. Menentukan golongan senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol daun sirih yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Propionibacterium acne* dan *Staphylococcus aureus* multiresisten dengan metode bioautografi.

D. Tinjauan Pustaka

1. Daun sirih (*Piper betle* L.)

a. Sistematika

Divisi : Spermatophyta

Sub Divisi : Angiospermae

Kelas : Dicotyledoneae

Bangsa : Piperales

Suku : Piperaceae

Marga : Piper

Jenis : *Piper betle* L.

(Hutapea, 1997)

b. Bagian tanaman yang digunakan

Daun, akar, buah, dan minyak berkhasiat obat (Dalimartha, 2006).

c. Khasiat

Simplisia daun sirih berkhasiat sebagai antisariaawan, antibatuk, *astringent*, dan antiseptik (Anonim, 1980).

d. Kandungan kimia

Daun sirih mengandung saponin, flavonoid, polifenol, dan minyak atsiri (Anonim, 2000).

2. Metode Penyarian

Penyarian merupakan peristiwa perpindahan massa zat aktif yang semula berada di dalam sel, ditarik oleh cairan penyari sehingga zat aktif larut dalam

cairan penyari. Pada umumnya penyarian akan bertambah baik bila permukaan serbuk simplisia yang bersentuhan dengan penyari semakin luas (Anonim, 1986).

Proses ekstraksi merupakan proses penarikan zat pokok yang diinginkan dari bahan mentah obat dengan menggunakan pelarut yang dipilih dimana zat yang diinginkan larut. Bahan mentah obat berasal dari tumbuh-tumbuhan atau hewan tidak perlu diproses lebih lanjut kecuali dikumpulkan dan dikeringkan. Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau hewani menggunakan pelarut yang sesuai. Kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian rupa hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (Ansel, 1989).

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

Maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (kamar). Secara teknologi termasuk ekstraksi dengan prinsip metode pencapaian konsentrasi pada keseimbangan. Maserasi kinetik berarti dilakukan pengadukan yang kontinyu (terus-menerus). Remaserasi berarti dilakukan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama dan seterusnya (Anonim, 2000).

3. *Propionibacterium acne*

Sistematika *Propionibacterium acne* adalah sebagai berikut:

Divisi	: Actinobacteria
Kelas	: Actinobacteridae
Bangsa	: Actinomycetales
Suku	: Propionibacteriaceae
Marga	: Propionibacterium
Jenis	: <i>Propionibacterium acne</i>

Propionibacterium acne adalah organisme yang pada umumnya memberi kontribusi terhadap terjadinya jerawat (Jawetz *et al.*, 2001). *Propionibacterium acne* termasuk bakteri yang tumbuh relatif lambat. Bakteri ini tipikal bakteri anaerob Gram positif yang toleran terhadap udara. Genom dari bakteri ini telah dirangkai dan sebuah penelitian menunjukkan beberapa gen yang dapat menghasilkan enzim untuk meluruhkan kulit dan protein, yang mungkin *immunogenic* (mengaktifkan sistem kekebalan tubuh) (Pramasanti, 2008). Bakteri ini juga mempunyai kemampuan untuk menghasilkan katalase beserta indol, nitrat, atau kedua-duanya indol dan nitrat. *Propionibacterium* menyerupai *Corynebacterium* secara morfologi dan susunannya, tetapi tidak bersifat toksigenik (Brahman, 2007).

Ciri-ciri penting dari bakteri *Propionibacterium acne* adalah berbentuk batang tak teratur yang terlihat pada pewarnaan Gram positif. Bakteri ini dapat tumbuh di udara dan tidak menghasilkan endospora. Bakteri ini dapat berbentuk filamen bercabang atau campuran antara bentuk batang/filamen dengan bentuk

kokoid. *Propionibacterium acne* memerlukan oksigen mulai dari aerob atau anaerob fakultatif sampai ke mikroerofilik atau anaerob. Beberapa bersifat patogen untuk hewan dan tanaman (Pramasanti, 2008).

Sebagian besar bakteri ini hidup berkelompok dan biasanya terdapat di kebanyakan kulit manusia; serta hidup di asam lemak dalam kelenjar minyak di sebum yang dikeluarkan oleh pori-pori. Bakteri ini juga dapat ditemukan sepanjang sistem gastrointestinal pada manusia dan binatang lainnya. Bakteri ini dinamai menurut kemampuannya untuk menghasilkan asam propionat (Anonim, 2007).

4. *Staphylococcus aureus*

Sistematika *Staphylococcus aureus* adalah sebagai berikut:

Divisi	: Protophyta
Kelas	: Schizomycetes
Bangsa	: Eubacteriales
Suku	: Micrococcaceae
Marga	: Staphylococcus
Jenis	: <i>Staphylococcus aureus</i>

Staphylococcus bersifat patogen, non motil, dan memproduksi katalase (Levinson, 2004). *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri Gram positif, tidak membentuk spora, tak bergerak dan dapat tumbuh pada berbagai media pada suasana aerob. Bakteri ini dapat memfermentasikan beberapa karbohidrat dan dapat menghasilkan pigmen yang berwarna, tidak dapat larut air (Jawetz *et al.*, 2001).

Staphylococcus mengandung polisakarida dan protein yang bersifat antigenik. Antigen ini merupakan kompleks peptidoglikan asam teikhoat dan dapat menghambat fagositosis dan bagian ini yang diserang bakteriofaga. Staphylococcus bersifat lisogenik yaitu yang mengandung faga yang tidak berpengaruh pada dirinya sendiri, tetapi menyebabkan lisis pada anggota dari spesies sama. *S. aureus* merupakan kuman patogen yang bersifat invasif, penyebab hemolisis, membentuk koagulase, mencairkan gelatin, membentuk pigmen kuning emas (Warsa, 1994).

Staphylococcus biasanya memfermentasi manitol dan menghemolisis sel darah merah (Levinson, 2004). Staphylococcus dapat menyebabkan peradangan setempat, nekrosis, dan pembentukan abses. Pada penyebaran ke bagian tubuh lain melewati pembuluh getah bening dan pembuluh darah (Warsa, 1994). Staphylococcus menyebabkan penyakit bisul, berbagai penyakit pyogenik, keracunan makanan, dan *toxic shock syndrome* (Levinson, 2004).

Obat yang digunakan untuk mengobati infeksi yang disebabkan oleh bakteri *S. aureus* adalah penisilin G untuk infeksi yang ringan, pada infeksi yang berat atau yang resisten terhadap penisilin dapat diberikan metisilin. Penderita yang alergi terhadap penisilin, dapat diberikan sefalosporin, eritromisin, linkomisin, atau klindamisin (Warsa, 1994).

5. Standar Kekeruhan McFarland

Standar McFarland berada dalam bentuk skala yang bernomor dari 1 sampai 10, yang menjelaskan konsentrasi spesifik dari bakteri per mL. Ini didesain untuk digunakan dalam mengestimasi konsentrasi bakteri Gram negatif.

Tabel 1. Jumlah Bakteri Sesuai dengan Skala McFarland

Skala McFarland	Jumlah Bakteri ($\times 10^6/\text{mL}$)
1	300
2	600
3	900
4	1.200
5	1.500
6	1.800
7	2.100
8	2.400
9	2.700
10	3.000

Tube standar McFarland dilabeli 1 sampai 10 yang diisi dengan suspensi dari garam barium. Kekeruhan larutan bakteri pada tiap tube kurang lebih sesuai dengan nomor skala McFarland. Jadi, tube nomor 7 menggambarkan kekeruhan bakteri pada konsentrasi $2,1 \times 10^9/\text{mL}$. Untuk menentukan perkiraan populasi dari sebuah suspensi bakteri, kekeruhannya secara visual dapat dibandingkan dengan 1 set standar McFarland. Jika kekeruhan turun antara tube nomor 7 dan 8, maka sejumlah bakteri per ml akan berada diantara 2,1 dan 2,4 milyar/mL. Keuntungan dari standar yang tanpa masa inkubasi atau peralatan khusus ini dibutuhkan untuk mengestimasi banyaknya bakteri.

Bahan-bahan yang digunakan dalam standar McFarland antara lain:

Larutan 1 : 1% Barium Klorida encer (1% wt/vol BaCl₂)

Larutan 2 : 1% Asam Sulfat encer (1% wt/vol H₂SO₄)

Tabel 2. Berbagai Macam Standar McFarland

Standar McFarland	
No. 1	0,1 mL Barium Klorida dalam 9,9 mL Asam Sulfat
No. 2	0,2 mL Barium Klorida dalam 9,8 mL Asam Sulfat
No. 3	0,3 mL Barium Klorida dalam 9,7 mL Asam Sulfat
No. 4	0,4 mL Barium Klorida dalam 9,6 mL Asam Sulfat
No. 5	0,5 mL Barium Klorida dalam 9,5 mL Asam Sulfat
No. 6	0,6 mL Barium Klorida dalam 9,4 mL Asam Sulfat
No. 7	0,7 mL Barium Klorida dalam 9,3 mL Asam Sulfat
No. 8	0,8 mL Barium Klorida dalam 9,2 mL Asam Sulfat
No. 9	0,9 mL Barium Klorida dalam 9,1 mL Asam Sulfat
No. 10	1,0 mL Barium Klorida dalam 9,0 mL Asam Sulfat

Standar McFarland tersedia di pasaran (Whitman dan MacNair, 2010).

6. Pengecatan Gram

Pengecatan Gram adalah salah satu cara pengecatan untuk membedakan bakteri. Berdasarkan pengecatannya dibedakan menjadi bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif. Pengecatan Gram dimulai dengan pemberian zat warna dasar kristal ungu kemudian diberi larutan iodium. Bakteri Gram positif akan mempertahankan kompleks kristal ungu iodium dan tetap berwarna ungu.

Sedangkan pada bakteri Gram negatif akan hilang dengan alkohol. Zat warna kontras (merah) dituangkan sehingga bakteri Gram negatif kehilangan warna dan akan mendapatkan warna kontras, sedangkan bakteri Gram positif tetap berwarna ungu (Jawetz, *et al.*, 2005).

7. Antibakteri

Antibakteri adalah obat atau senyawa kimia yang digunakan untuk membasmi bakteri, khususnya bakteri yang bersifat merugikan manusia. Beberapa istilah yang digunakan untuk menjelaskan proses pembasmian bakteri yaitu germisid, bakterisid, bakteriostatik, antiseptik, dan desinfektan (Pelczar dan Chan, 1988).

Berdasarkan sifat toksisitas selektif, ada antibakteri yang bersifat menghambat pertumbuhan bakteri yang dikenal sebagai bakteriostatik, dan ada yang bersifat membunuh bakteri dikenal sebagai bakterisid. Kadar minimal yang diperlukan untuk menghambat atau membunuh bakteri, masing-masing dikenal sebagai kadar hambat minimum (KHM) dan kadar bunuh minimum (KBM). Antibakteri tertentu aktivitasnya dapat meningkat menjadi bakterisid bila kadar antimikrobanya ditingkatkan melebihi KHM (Ganiswara, dkk., 1995).

8. Uji Aktivitas Antibakteri

Pengujian terhadap aktivitas antimikroba dilakukan untuk mengetahui obat-obat yang paling poten untuk kuman penyebab penyakit terutama penyakit kronis. Pengujian ini dapat dilakukan dengan beberapa cara, yaitu:

a. Difusi Agar

Media yang dipakai adalah agar Mueller Hinton. Pada metode difusi ini ada beberapa cara, yaitu:

1) Cara Kirby Bauer

Beberapa koloni kuman dari pertumbuhan 24 jam diambil, disuspensikan ke dalam 0,5 mL Brain Heart Infusion (BHI) cair, diinkubasikan 5-8 jam pada 37⁰C. Suspensi ditambah akuades steril hingga kekeruhan tertentu sesuai dengan standar Brown dengan konsentrasi bakteri 10⁸ CFU per mL. Kapas lidi steril dicelupkan ke dalam suspensi bakteri lalu ditekan-tekan pada dinding tabung hingga kapasnya tidak terlalu basah, kemudian dioleskan pada permukaan media agar hingga rata. Kemudian kertas samir (disk) yang mengandung antibakteri diletakkan di atasnya, diinkubasi pada 37⁰C selama 18-24 jam, hasilnya dibaca:

- a. Zona radikal yaitu suatu daerah di sekitar disk dimana sama sekali tidak ditemukan adanya pertumbuhan bakteri. Potensi antibakteri diukur dengan mengukur diameter dari zona radikal.
- b. Zona irradikal yaitu suatu daerah di sekitar disk dimana pertumbuhan bakteri dihambat oleh antibakteri tetapi tidak dimatikan (Anonim, 1993).

2) Cara Sumuran

Beberapa koloni kuman dari pertumbuhan 24 jam diambil, disuspensikan ke dalam 0,5 mL Brain Heart Infusion (BHI) cair, diinkubasi pada 37⁰C selama 5-8 jam. Suspensi ditambah akuades steril hingga kekeruhan tertentu sesuai dengan standar konsentrasi bakteri 10⁸ CFU per mL. Kapas lidi steril dicelupkan ke dalam

suspensi bakteri lalu ditekan-tekan pada dinding tabung hingga kapasitasnya tidak terlalu basah, kemudian dioleskan pada permukaan media agar hingga rata. Media agar dibuat sumuran dengan garis tengah tertentu, larutan antibakteri diteteskan ke dalam sumuran, diinkubasi pada 37⁰C selama 18-24 jam. Hasilnya dibaca seperti Kirby Bauer (Anonim, 1993).

3) *Cara Pour Plate*

Beberapa koloni kuman dari pertumbuhan 24 jam diambil, disuspensikan ke dalam 0,5 mL Brain Heart Infusion (BHI) cair, diinkubasi 37⁰C selama 5-8 jam. Suspensi ditambah akuades steril hingga kekeruhan tertentu sesuai dengan standar konsentrasi bakteri 10⁸ CFU per mL. Suspensi bakteri diambil satu mata ose dan dimasukkan ke dalam 4 mL agar base 1,5% yang mempunyai temperatur 50⁰C. Setelah suspensi kuman tersebut homogen dituang ke dalam media agar Mueller Hinton, ditunggu sebentar sampai agar tersebut membeku, disk diletakkan di atas media dan diinkubasi 15-20 jam dengan temperatur 37⁰C. Hasil dibaca sesuai dengan standar masing-masing antibakteri (Anonim, 1993).

b. Dilusi Cair atau Dilusi Padat

Pada prinsipnya antibakteri diencerkan sampai diperoleh beberapa konsentrasi. Pada dilusi cair, masing-masing konsentrasi obat ditambah suspensi kuman dalam media. Sedangkan pada dilusi padat tiap konsentrasi obat dicampur dengan media agar, lalu ditanami bakteri (Anonim, 1993).

9. Resistensi Bakteri

Resistensi bakteri terhadap antibiotik membuat masalah yang dapat menggagalkan terapi dengan antibiotik. Resistensi dapat merupakan masalah

individual epidemiologi. Resistensi adalah ketahanan mikroba terhadap antibiotik tertentu yang dapat berupa resistensi alamiah, resistensi karena adanya mutasi spontan (resistensi kromosomal) dan resistensi karena adanya faktor R pada sitoplasma (resistensi ekstrakromosomal) atau resistensi karena pemindahan gen yang resisten atau faktor R atau plasmid (resistensi silang) (Wattimena dkk., 1991)

Penyebab terjadi resistensi mikroba adalah penggunaan antibiotik yang tidak tepat, misalnya penggunaan dengan dosis yang tidak memadai, pemakaian yang tidak teratur atau tidak kontinyu, demikian juga waktu pengobatan yang tidak cukup lama. Maka untuk mencegah atau memperlambat timbulnya resistensi mikroba, harus diperhatikan cara-cara penggunaan antibiotik yang tepat (Wattimena dkk., 1991).

a. Resistensi Alamiah

Beberapa mikroba secara alamiah tidak peka terhadap antibiotik tertentu. Hal ini disebabkan oleh tidak adanya reseptor yang cocok atau dinding sel mikroba tidak dapat ditembus oleh antibiotik. Oleh sebab itu antibiotik tersebut mempunyai kekosongan dalam spektrum kerjanya.

b. Resistensi Kromosomal

Resistensi kromosom terjadi karena mutasi spontan pada gen kromosom. Kromosom yang telah termutasi ini dapat dipindahkan sehingga terjadi populasi yang resisten. Pemindahan kromosom ini mengakibatkan terjadi resistensi silang. Pada mutasi spontan terjadi seleksi oleh antibiotik dimana bibit yang peka akan musnah dan bibit yang resisten akan tetap dan berkembang biak.

c. Resistensi Ekstrakromosomal

Dalam resistensi ekstrakromosomal, yang berperan adalah faktor R yaitu kelompok plasmid yang membawa gen resistensi terhadap satu atau beberapa obat antimikroba. Faktor R dipindahkan dari bakteri yang satu ke bakteri yang lain sehingga terjadi resistensi silang. Dengan cara ini bakteri dapat memperoleh sekaligus gen yang resisten terhadap enam sampai tujuh antibiotik. Perpindahan resistensi dapat terjadi dengan cara transformasi, transduksi, dan konjugasi (Wattimena dkk., 1991).

10. Media

Media adalah suatu bahan yang terdiri atas campuran nutrisi/nutrien/zat makanan yang dipakai untuk menumbuhkan mikroba. Susunan dan kadar nutrisi dalam suatu media untuk mikroba harus seimbang agar pertumbuhan mikroba dapat sebaik mungkin. Hal ini perlu dikemukakan mengingat banyak senyawa-senyawa yang menjadi penghambat atau menjadi racun bagi mikroba kalau kadarnya terlalu tinggi (misalnya garam-garam dari asam lemak, gula, dan lain-lain) (Anonim, 1989).

Supaya mikroba dapat tumbuh dengan baik dalam suatu media, perlu dipenuhi syarat-syarat sebagai berikut:

- 1). Media harus mengandung semua nutrisi yang mudah digunakan oleh mikroba.
- 2). Media harus mempunyai tekanan osmose, tegangan permukaan dan pH yang sesuai.
- 3). Media tidak mengandung zat-zat penghambat.

4). Media harus steril.

(Anonim, 1989)

11. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi Lapis Tipis merupakan metode pemisahan fisikokimia, lapisan yang memisahkan terdiri atas bahan berbutir-butir (fase diam), ditempatkan dalam penyangga berupa pelat gelas, logam atau lapisan lain yang cocok. Campuran yang akan dipisahkan berupa larutan yang ditotolkan sebagai bercak/pita (awal). Setelah pelat atau lapisan ditaruh di dalam bejana tertutup rapat yang berisi larutan yang cocok (fase gerak), pemisahan terjadi selama perambatan kapiler selanjutnya senyawa yang tidak berwarna harus ditampakkan (deteksi) (Stahl, 1985).

Fase diam yang digunakan dalam kromatografi lapis tipis diantaranya adalah silika gel, alumina, kieselgur, dan selulosa (Sudjadi, 1988). Fase gerak atau pelarut pengembang merupakan medium angkut yang terdiri satu atau beberapa pelarut yang bergerak di dalam fase diam (suatu lapisan yang berpori) karena adanya gaya kapiler. Pelarut pengembang dapat dikelompokkan ke dalam deret eluotropik berdasarkan efek solusinya (Stahl, 1985).

Hasil yang diperoleh diidentifikasi di bawah lampu UV (254 dan 366 nm), ditandai dengan ada atau tidaknya fluoresensi. Jika tidak tampak dengan cara di atas, maka dilakukan secara kimia yaitu penyemprotan dengan pereaksi yang sesuai (Auterhoff dan Kovar, 1987).

Hasil KLT dinilai dengan beberapa parameter antara lain:

- a. Jarak pengembangan senyawa pada kromatogram biasanya dinyatakan dengan R_f/hR_f

$$R_f = \frac{\text{Jarak titik pusat bercak dari titik awal}}{\text{Jarak pengembangan}}$$

Angka R_f berjarak antara 0,00 sampai 1,00 dan hanya dapat ditentukan 2 desimal. Harga ini merupakan ukuran kecepatan migrasi suatu senyawa pada kromatografi dan pada kondisi konstan merupakan besaran karakteristik dan reproduibel.

Faktor-faktor yang mempengaruhi harga R_f antara lain: struktur kimia dari senyawa yang dipisahkan sifat dari penyerap dan derajat keaktifanya, tebal penyerap, pelarut, kejenuhan bejana pengembang, dan suhu percobaan (Gritter dkk., 1991). hR_f adalah angka R_f dikalikan faktor 100 (h), menghasilkan nilai berjangka antara 0 sampai 00 (Stahl, 1985).

- b. Penilaian Visual

Pada penilaian visual kromatogram, hal yang dapat diamati adalah:

- 1). Jarak pengembangan komponen larutan cuplikan dibandingkan dengan jarak pengembangan larutan pembanding.
- 2). Fluoresensi/pemadaman fluoresensi (warna)
- 3). Perbandingan dan luas bercak memberikan informasi angka banding kuantitatif (Stahl, 1985).

c. **Pereaksi Kimia**

Beberapa pereaksi kimia yang dapat digunakan untuk mendeteksi kandungan kimia yang terdapat dalam fraksi aktif, antara lain:

- 1). Pereaksi uap amoniak, untuk mendeteksi senyawa flavonoid. Bercak berwarna kuning.
- 2). Pereaksi FeCl_3 , untuk mendeteksi senyawa fenolik. Bercak berwarna abu-abu, hijau sampai biru setelah pemanasan.
- 3). Pereaksi Liebermann Burchard (LB), untuk mendeteksi saponin. Saponin steroid bercak berwarna biru atau hijau, untuk triterpenoid bercak berwarna merah, merah jambu, ungu/violet.
- 4). Pereaksi anisaldehyd- H_2SO_4 , untuk mendeteksi minyak atsiri. Bercak berwarna biru, hijau, merah, atau coklat (Harborne, 1996).

12. Bioautografi

Metode yang spesifik untuk mendeteksi bercak pada kromatogram hasil kromatografi lapis tipis (KLT) dan kromatografi kertas yang mempunyai aktivitas sebagai antibakteri, antifungi, antibiotik dan antiviral disebut bioautografi (Djide , 2003).

Bioautografi dibagi menjadi 2 metode, yaitu:

a. **Bioautografi langsung**

Bioautografi langsung dilakukan dengan cara menyemprotkan *plate* KLT dengan suspensi bakteri atau dengan menyentuh *plate* KLT pada permukaan media agar. Setelah inkubasi selama waktu tertentu maka letak zat aktif

antimikrobia ditandai dengan adanya zona jernih pada media yang telah ditumbuhi bakteri.

b. Bioautografi *overlay*

Bioautografi *overlay* dilakukan dengan cara menuangkan media agar bakteri di atas permukaan *plate* KLT, setelah media padat kemudian diinkubasi. Penampakan zona hambatan dilakukan dengan penyemprotan menggunakan larutan tetrazolium klorida, maka letak zat aktif antimikroba ditandai dengan adanya zona jernih dengan latar belakang ungu (Rehalison, 1994).

E. Keterangan Empiris

Dari penelitian ini diharapkan didapat suatu data ilmiah tentang aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun sirih terhadap *Propionibacterium acne* dan *Staphylococcus aureus* multiresisten.