

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI KLOOROFORM
EKSTRAK ETANOL KAYU SECANG (*Caesalpinia sappan* L.)
TERHADAP *Staphylococcus aureus* DAN *Shigella dysenteriae*
SERTA BIOAUTOGRAFINYA**

SKRIPSI



Oleh :

**PUTRI AYUNINGTYAS
K 100 050 080**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SURAKARTA
SURAKARTA
2009**

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. Infeksi dapat disebabkan oleh berbagai mikroorganisme dan bisa juga disebabkan dengan munculnya 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 yang dapat menyebabkan kematian sulit dicapai (Jawetz, dkk., 2001).

Penyakit infeksi dapat diobati dengan tanaman tradisional. Hal ini disebabkan sadarnya masyarakat akan efek samping obat sintetik yang lebih besar dibandingkan dengan obat tradisional. Di samping itu obat tradisional harganya relatif lebih murah dan mudah untuk didapatkan (Anonim, 2000).

Disentri basiler adalah penyakit yang endemis di Indonesia, hal ini antara lain disebabkan sanitasi lingkungan yang belum memadai. Penyebaran kuman shigella adalah dari manusia ke manusia yang lain. Shigella disebarkan oleh lalat, tangan yang kotor, makanan yang terkontaminasi, tinja serta barang-barang lain yang terkontaminasi ke orang lain yang sehat (Karsinah, dkk., 1994).

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) merupakan penyebab penting penyakit infeksi. Dalam keadaan normal *S. aureus* terdapat di dalam saluran pernafasan

atas, kulit, saluran cerna, dan vagina. *S. aureus* dapat menyebabkan timbulnya penyakit dengan tanda-tanda yang khas, yaitu peradangan, nekrosis, dan pembentukan abses (Warsa, 1993).

Salah satu tanaman yang berkhasiat obat yang dapat digunakan sebagai obat tradisional adalah kayu secang. Serbuknya berwarna merah jingga kecoklatan. Kayu secang sering digunakan untuk pewarna minuman. Kegunaan kayu secang di masyarakat adalah untuk pembersih darah, penawar racun, penyembuh pasca persalinan, batuk darah, penyakit mata dan disentri (Hariana, 2006).

Pada penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa fraksi metanol kayu secang dapat menghambat pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (Kuswandi, dkk., 2002). Fraksi etanol memiliki daya antibakteri terhadap *Proteus vulgaris*, *Coliform*, dan *Diphtheroid* (Anis, 1990).

Penelitian ini dimaksudkan untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari kayu secang (*C. sappan* L.) terhadap bakteri Gram positif (*S. aureus*) dan Gram negatif (*S. dysentriae*) dengan menggunakan penyari non polar (kloroform) dari ekstrak etanol, serta mengetahui senyawa dari fraksi kloroform tersebut yang memiliki aktivitas antibakteri dengan metode bioautografi.

B. Perumusan Masalah

Berdasarkan pada latar belakang penelitian di atas dapat dirumuskan permasalahan yaitu :

1. Apakah fraksi kloroform ekstrak etanol kayu secang mempunyai aktivitas terhadap *S. aureus* dan *S. dysenteriae*, serta berapa Kadar Bunuh Minimal (KBM)nya?
2. Senyawa kimia apa yang terdapat di dalam fraksi kloroform ekstrak etanol kayu secang yang mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* dan *S. dysenteriae*?

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan :

1. Mengetahui aktivitas fraksi kloroform ekstrak etanol pada kayu secang terhadap *S. aureus* dan *S. dysenteriae*, serta mengetahui Kadar Bunuh Minimal (KBM)nya.
2. Mengetahui senyawa kimia yang terkandung di dalam fraksi kloroform ekstrak etanol kayu secang yang mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* dan *S. dysenteriae*.

D. Tinjauan Pustaka

1. Tanaman Secang (*Caesalpinia sappan* L.)

- a. Klasifikasi dari tanaman secang sebagai berikut :

Divisi : Magnoliophyta

Sub divisi : Angiospermae

Kelas : Magnoliopsida

Bangsa : Rosales

Suku : Caesalpiniaceae
 Marga : Caesalpinia
 Jenis : *Caesalpinia sappan* L.

(Iriawati, 2008)

b. Nama daerah

Sumatra : seupeung (Aceh), sepang (Gayo), sopang (Batak), cacang (Minangkabau)
 Jawa : secang (Sunda), kayu secang (Jawa), kaju secang (Madura)
 Nusa tenggara : cang (Bali), sepang (Sasak), supa (Bima), sepel (Timor), hape (Sawu), hong (Alor), sepe (Roti)
 Sulawesi : kayu sema (Menado), dolo (Bare), sapang (Makasar), sepang (Bugis)
 Maluku : sefen (Halmahera selatan), salawa, hinianga, sinyiaga, singiang (Halmahera), sunyiha (Ternate), roro (Tidore)
 (Anonim, 1977).

c. Uraian tanaman

Morfologi dari *C. sappan* L. adalah semak atau pohon kecil, tinggi sampai 10 m. Ranting-ranting berlentisel dan berduri, bentuk duri bengkok, tersebar. Daun majemuk, panjang 25-40 cm, bersisip, panjang sisip 9-15 cm, setiap sirip mempunyai 10-20 pasang anak daun yang berhadapan. Anak daun bertangkai, bentuk lonjong, pangkal hampir ramping, ujung bundar serta sisinya agak sejajar, panjang anak daun 10-25 mm, lebar 3-11 mm. Perbungaan berupa malai, terdapat di ujung, panjang mulai 10-40 cm; panjang gagang bunga 15-

20cm; pinggir kelopak berambut, panjang kelopak yang terbawah lebih kurang 10 mm, lebar lebih kurang 4 mm, empat daun lainnya panjang lebih kurang 7 mm, lebar lebih kurang 4 mm; tajuk memencar berwarna kuning, helaian membulat bergaris tengah 4-6 mm, empat helai daun tajuk lainnya juga membulat dan bergaris tengah lebih kurang 10 mm; panjang benang sari lebih kurang 15 mm, panjang putik lebih kurang 18 mm. Polong berwarna hitam, panjang 8-10 cm, lebar 3-4 cm, berisi 3-4 biji, panjang biji 15-18 mm, lebar 8-11 mm, tebal 5-7 mm (Anonim, 1977).

Kayu secang adalah potongan-potongan atau serutan kayu *C. sappan* L. Tidak berbau dan rasa agak kelat. Biasanya ditanam sebagai tanaman pagar atau tanaman pinggiran (Hariana, 2006).

d. Kandungan kimia

Kayu secang mengandung asam galat, brazilin (zat merah sappan) dan asam tanat (Kartasapoetra, 2004), *delta-alfa-phelandrene*, *oscimene*, resin, resorsin, minyak atsiri, dan tannin. Sementara daunnya mengandung 0,16-0,20% minyak atsiri yang beraroma enak dan tidak berwarna (Hariana, 2006).

e. Manfaat tanaman

Kayu secang digunakan sebagai pembersih darah, penawar racun, penyembuhan pasca persalinan, batuk, penyakit mata, dan disentri (Hariana, 2006). Tanaman secang juga digunakan untuk pengobatan diare, batuk darah pada TBC, muntah darah, malaria, luka berdarah, memar berdarah, luka dalam, tetanus, tumor, dan nyeri karena gangguan sirkulasi darah (Kartasapoetra, 2004). Panen kayu dapat dilakukan mulai umur 1-2 tahun. Kayunya bila direbus memberi warna

merah, dapat digunakan untuk pengecatan, memberikan warna pada anyaman, kue, minuman atau sebagai tinta. Perbanyakkan dengan biji atau stek batang (Anonim, 1977).

2. Media

Media dapat dianggap sebagai campuran zat-zat organik maupun anorganik yang digunakan untuk menumbuhkan bakteri dengan syarat-syarat tertentu. Agar bakteri patogen dapat dibiakan dengan baik, diperlukan tempat (media) yang memungkinkannya bertumbuh dan berkembang secara optimal. Oleh karena itu media pembiakan harus mengandung cukup nutrisi untuk pertumbuhan bakteri, selain suhu dan pH yang harus sesuai. Media pembiakan ada yang padat dan ada yang cair. Media padat, umumnya media agar-agar, terdapat dalam cawan petri atau dalam tabung reaksi atau botol khusus (Tambayong, 2000).

Syarat-syarat yang harus dipenuhi oleh suatu media :

a. Susunan makanan

Dalam suatu media yang digunakan harus mengandung air, sumber karbon, sumber nitrogen, mineral, vitamin, dan gas.

b. Tekanan osmosis

Sifat-sifat bakteri yang sama seperti sifat-sifat sel yang lain terhadap tekanan osmosis, maka bakteri untuk pertumbuhannya membutuhkan media yang isotonis. Bila media tersebut hipotonis maka bakteri akan mengalami plasmoptysis, sedangkan bila media tersebut hipertonis maka akan plasmolisis.

c. Derajat keasaman (pH)

Pada umumnya pH dari suatu media berada di sekitar daerah netral. Namun ada bakteri tertentu yang membutuhkan pH yang sangat alkalis untuk pertumbuhan yang optimum.

d. Temperatur

Untuk mendapatkan pertumbuhan optimum, bakteri membutuhkan temperatur tertentu. Misalnya bakteri patogen membutuhkan temperatur 37°C sesuai dengan temperatur badan.

e. Sterilitas

Sterilitas media merupakan suatu syarat yang sangat penting. Apabila media yg digunakan tidak steril, maka tidak dapat dibedakan dengan pasti apakah bakteri tersebut berasal dari material yang diperiksa ataukah merupakan kontaminan. Untuk mendapatkan suatu media yang steril maka setiap tindakan serta alat-alat yang digunakan harus steril dan dikerjakan secara aseptik (Anonim, 1993).

3. Bakteri

Bakteri merupakan organisme bersel tunggal yang berkembang baik dengan pembelahan menjadi dua sel. Bakteri dibagi menjadi kelas-kelas menurut bentuknya:

Kokus : berbentuk bulat

Basil : batang lurus

Kokobasil : bentuk antara kokus dan basil

Vibrio : batang lempeng

Spiroceta : spiral

(Gibson, 1996).

Bakteri hidup tersebar di alam, antara lain di tanah, udara, air dan makanan. Secara garis besar bakteri dapat dibedakan atas 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 yang 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).

a. *Staphylococcus aureus*

1) Klasifikasi *Staphylococcus aureus*

Divisi : Protophyta

Kelas : Schizomycetes

Bangsa : Eubacteriaceae

Suku : Micrococcaceae

Marga : Staphylococcus

Jenis : *Staphylococcus aureus* (Salle, 1961).

2) Ciri-ciri khas organisme

Staphylococcus aureus adalah bakteri Gram positif, berpasangan, berantai pendek atau bergerombol, tidak membentuk spora, tidak berkapsul, dan dinding selnya mempunyai dua komponen utama yaitu peptidoglikan dan asam teikhoat.

Infeksi *S. aureus* dapat juga disebabkan oleh kontaminasi langsung pada luka, misalnya pada luka infeksi pasca bedah oleh Staphylococcus atau infeksi setelah trauma (osteomielitis kronis setelah fraktur terbuka, meningitis setelah fraktur tengkorak). Bila *S. aureus* menyebar dapat terjadi endokarditis, osteomielitis akut hematogen, meningitis, atau infeksi paru-paru (Anonim, 2008).

3) Fisiologi

Staphylococcus mudah tumbuh pada kebanyakan pembenihan bakteriologik, dalam keadaan aerobik atau mikroaerobik. Staphylococcus tumbuh paling cepat pada suhu kamar 37⁰C, paling baik membentuk pigmen pada suhu kamar 20⁰C dan pada media dengan pH 7,2-7,4. Koloni pada pembenihan padat berbentuk bulat, halus menonjol dan berkilau-kilauan membentuk pigmen (Jawetz dkk., 2005).

b. *Shigella dysenteriae*

1). Klasifikasi *Shigella dysenteriae*

Divisi	: Protophyta
Kelas	: Schizomycetes
Bangsa	: Eubacteriaceae
Suku	: Enterobacteriaceae
Marga	: Shigella
Jenis	: <i>Shigella dysenteriae</i> (Karsinah dkk., 1994)

2). Ciri-ciri khas organisme

Shigella adalah batang Gram negatif ramping; bentuk kokobasil ditemukan pada biakan muda (Jawetz dkk., 2005). Spesies *Shigella* adalah kuman patogen usus yang telah lama dikenal sebagai agen penyebab penyakit disentri basiler (Karsinah dkk., 1994).

3). Fisiologi

Sifat pertumbuhan *Shigella* adalah aerob dan fakultatif anaerob, pH pertumbuhan 6,4-7,8 suhu pertumbuhan optimum 37°C kecuali *S. sonnei* dapat tumbuh pada suhu 45°C. Sifat biokimia yang khas adalah negatif pada reaksi fermentasi adonitol, tidak membentuk gas pada fermentasi glukosa, tidak membentuk H₂S kecuali *S. flexneri*, negatif terhadap sitrat, manitol, laktosa kecuali *S. sonnei* meragi laktosa secara lambat, dan negatif pada tes motilitas (Karsinah dkk., 1994).

4). Morfologi

Shigella berbentuk batang, ukuran 0,5-0,7 µm x 2-3 µm, pada pewarnaan Gram bersifat Gram negatif, tidak berflagel (Karsinah dkk., 1994).

5) Pengobatan infeksi *Shigella*

Obat yang digunakan untuk mengobati disentri basiler adalah tetrasiklin 4 kali sehari 250 mg, kotrimoksazol 2 kali sehari 500 mg, semuanya selama 3-5 hari (Tjay dkk., 2002).

4. Antibakteri

Antibakteri adalah suatu senyawa yang dihasilkan oleh suatu mikroorganisme dan dalam konsentrasi kecil mampu menghambat bahkan

membunuh proses kehidupan suatu mikroorganisme (Jawetz dkk., 1996). Berdasarkan sifat toksisitas selektif, ada antibakteri yang bersifat menghambat pertumbuhan bakteri yang dikenal sebagai bakteristatik, dan ada yang bersifat membunuh bakteri dikenal sebagai bakterisid. Kadar minimal yang diperlukan untuk menghambat dan membunuh bakteri, masing-masing dikenal sebagai Kadar Hambat Minimal (KHM) dan Kadar Bunuh Minimal (KBM). Antibakteri tertentu aktivitasnya dapat meningkat menjadi bakterisid bila kadar antimikrobanya ditingkatkan melebihi KHM (Ganiswara dkk., 1995).

5. Uji Aktivitas Antibakteri

Pengujian terhadap aktivitas antibakteri dapat dilakukan dengan berbagai cara, yaitu :

a. Agar difusi

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

1). Cara Kirby Bauer

Suspensi bakteri yang telah ditambahkan akuades hingga konsentrasi 10^8 CFU/ml dioleskan pada media agar hingga rata, kemudian kertas samir (disk) diletakkan di atasnya. Hasilnya dibaca :

- a) *Radical zone* yaitu suatu daerah di sekitar *disk* dimana sama sekali tidak ditemukan adanya pertumbuhan bakteri. Potensi antibakteri diukur dengan mengukur diameter dari zona radikal.
- b) *Irradical zone* yaitu suatu daerah di sekitar *disk* dimana pertumbuhan bakteri dihambat oleh antibakteri, tetapi tidak dimatikan.

2). Cara Sumuran

Suspensi bakteri yang telah ditambahkan akuades hingga konsentrasi 10^8 CFU/ml dioleskan pada media agar hingga rata. Media agar dibuat sumuran diteteskan larutan antibakteri, diinkubasikan pada 37°C selama 18-24 jam. Hasilnya dibaca seperti cara Kirby Bauer.

3). Cara *Pour Plate*

Suspensi bakteri yang telah ditambahkan dengan akuades dan agar base, dituang pada media agar Mueller Hinton, *disk* diletakkan di atas media. Hasilnya dibaca sesuai standar masing-masing antibakteri.

b. Dilusi Cair/Dilusi Padat

Metode dilusi cair adalah metode untuk menentukan konsentrasi minimal dari suatu antibakteri yang dapat menghambat atau membunuh mikroorganisme. 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, kemudian ditanami bakteri. Konsentrasi terendah yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri ditunjukkan dengan tidak adanya kekeruhan disebut Kadar Hambat Minimal (KHM) atau *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) (Anonim, 1994).

6. Ekstraksi

Ekstrak adalah sediaan padat 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 sehingga memenuhi baku yang ditentukan (Anonim, 1995). Ekstraksi merupakan pemindahan massa zat yang semula berada di dalam sel, ditarik oleh cairan penyari sehingga terjadi pemindahan larutan zat aktif ke dalam cairan penyari (Anonim, 1986).

Metode penyarian yang digunakan tergantung dari wujud dan kandungan zat dari bahan tumbuhan yang diekstraksi dan serta jenis senyawa yang diisolasi (Voight, 1995). Ragam ekstraksi yang tepat sudah tentu bergantung pada tekstur dan kandungan air bahan tumbuhan yang diekstraksi dan pada jenis senyawa yang diisolasi. Jumlah dan jenis senyawa yang dapat dipisahkan menjadi fraksi yang berbeda sudah tentu berbeda, bergantung pada jenis tumbuhan (Harborne, 1987). Cara penyarian dapat dibedakan menjadi infundasi, maserasi, perkolasi, dan soxhletasi (Anonim, 1986).

Biasanya metode ekstraksi dipilih berdasarkan beberapa faktor seperti sifat dari bahan mentah obat dengan tiap macam metode ekstraksi dan kepentingan dalam memperoleh ekstrak yang sempurna atau mendekati sempurna dari obat. Sifat dari bahan mentah obat merupakan faktor utama yang harus dipertimbangkan dalam memilih metode ekstraksi (Ansel, 1989).

a. Metode Infundasi

Infundasi adalah proses penyarian yang umumnya digunakan untuk menyari zat kandungan aktif yang larut dalam air dan bahan-bahan nabati. Infus adalah sediaan cair yang dibuat dengan menyari simplisia menggunakan air pada suhu 90°C selama 15 menit (Anonim, 1986).

b. Metode Maserasi

Istilah *maceration* berasal dari bahasa Latin *macerare*, yang artinya merendam. Maserasi merupakan proses penyarian dengan cara serbuk direndam dalam pelarut sampai meresap dan melunakkan susunan sel, sehingga zat-zat yang mudah larut akan melarut (Ansel, 1989).

Lamanya waktu maserasi berbeda-beda tergantung pada sifat atau ciri campuran serbuk dan pelarut. Lamanya harus cukup supaya dapat memasuki semua rongga dari struktur serbuk dan melarutkan semua zat yang mudah larut. Lamanya maserasi bisa memerlukan waktu beberapa jam atau beberapa hari untuk ekstraksi yang optimum. Maserasi biasanya dilakukan pada temperatur 15°C-20°C dalam waktu selama 3 hari sampai bahan-bahan yang larut akan melarut (Ansel, 1989).

c. Metode Perkolasi

Istilah *perkolasi* berasal dari bahasa Latin *per* yang artinya melalui dan *colare* yang artinya merembes, secara umum dapat dinyatakan sebagai proses dimana serbuk simplisia yang sudah halus, zat yang larutnya diekstraksi dalam pelarut yang cocok dengan cara melewati perlahan-lahan melalui serbuk simplisia dalam suatu kolom. Serbuk simplisia dimampatkan dalam alat ekstraksi khusus disebut perkolator (Ansel, 1989).

d. Metode Soxhletasi

Soxhletasi merupakan penyarian dengan cara yaitu bahan yang akan disari berada dalam sebuah kantong simplisia (kertas atau karton) di bagian dalam alat ekstraksi dari gelas yang bekerja kontinyu. Wadah gelas yang mengandung

kantung diletakkan di antara labu penyulingan dengan pendinginan aliran balik dan dihubungkan dengan labu melalui pipa labu tersebut berisi bahan pelarut dan mencapai ke dalam pendingin aliran balik melalui sifon, berkondensasi di dalamnya, menetes di atas bahan yang akan diekstraksi dan menarik keluar bahan yang diekstraksi, lalu berkumpul di dalam wadah gelas dan setelah mencapai tinggi maksimalnya, secara otomatis dipindahkan ke dalam labu alas bulat. Dengan demikian zat yang terekstraksi terakumulasi melalui penguapan bahan pelarut murni berikutnya (Voight, 1995).

7. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) adalah metode pemisahan senyawa menggunakan fase diam berupa serbuk halus yang dilapiskan secara merata pada lempeng kaca, logam atau lapisan yang cocok. Campuran yang akan dipisahkan berupa bercak atau pita dan pemisahan terjadi selama perambatan (pengembangan). Selanjutnya senyawa yang tidak berwarna harus ditampakkan atau dideteksi. Untuk campuran yang tidak diketahui lapisan pemisah dan sistem larutan pengembang harus dipilih dengan tepat karena keduanya bekerja sama untuk mencapai pemisahan (Stahl, 1985).

Adapun kerugian KLT yaitu kurang tepat, kurang teliti, dan sukar dalam penyimpanan. Metode KLT ini sangat cocok untuk analisis di laboratorium farmasi karena hanya memerlukan investasi kecil untuk perlengkapan, menggunakan waktu singkat untuk menyelesaikan analisis (15-60 menit) dan memerlukan jumlah cuplikan yang sangat sedikit (kira-kira 0,1 g) (Stahl, 1985).

Hasil KLT ditentukan oleh fase diam (penyerap), fase gerak (pelarut), dan teknik kerja. Teknik kerja meliputi atmosfer bejana dan jenis pengembangan. Kondisi awal keberhasilan metode ini ditentukan oleh fase diam, fase gerak, bejana pemisah, cuplikan, cara dan jumlah penotolan, pembuatan cuplikan, dan deteksi senyawa yang dipisahkan (Harborne, 1987).

Fase diam berupa serbuk halus, dalam KLT bahan penyerap yang umum adalah silika gel, aluminium oksida, selulosa dan turunannya serta poliamida. Silika gel paling banyak digunakan dan dipakai untuk campuran senyawa lipofil maupun senyawa hidrofil (Stahl, 1985).

Pemilihan fase gerak adalah medium angkut dan terdiri atas beberapa pelarut yang bermutu baik. Dalam beberapa kasus pelarut tunggal memberikan hasil yang memuaskan, akan tetapi pelarut tunggal menggerakkan bercak terlalu jauh. Untuk mengatasi hal tersebut digunakan pelarut campuran. Penggunaan pelarut campuran sebaiknya akan cepat mengalami perubahan-perubahan fase terhadap perubahan suhu (Stahl, 1985).

Pada kromatogram kromatografi lapis tipis dikenal istilah atau pengertian faktor retardasi, (R_f) oleh tiap-tiap noda kromatogram yang didefinisikan sebagai :

$$R_f = \frac{\text{Jarak antara titik penotolan ke pusat bercak}}{\text{Jarak antara titik penotolan ke batas elusi}}$$

(Stahl, 1985)

8. 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 media agar di dalam 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 mikrobial uji, kemudian dicocokkan dengan hasil deteksi kromatogramnya dengan metode deteksi KLT yang sesuai. Dengan demikian dapat diperkirakan senyawa yang bertanggung jawab terhadap daya antimikroba (Zweig dan Whittaker, 1971).

E. Keterangan Empiris

Penelitian ini dilakukan untuk mendapat bukti ilmiah aktivitas fraksi kloroform ekstrak etanol kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Shigella dysenteriae* serta untuk mengetahui senyawa yang beraktivitas antibakteri dengan metode bioautografi.