

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA DAN LANDASAN TEORI

A. Tinjauan Pustaka

Penelitian antibakteri karies gigi telah banyak dilakukan diantaranya, Sabir (2005) melaporkan bahwa flavonoid dalam propolis *Trigona sp* dapat menghambat pertumbuhan *Streptococcus mutans* yang efektif pada konsentrasi 0,1% waktu inkubasi 24 jam, dan pada konsentrasi 0,5% waktu inkubasi 48 jam. Purnamasari, *et al.* (2010) melaporkan bahwa ekstrak etanol biji kakao dapat menghambat pertumbuhan *Streptococcus mutans* yang efektif pada konsentrasi 12,5%. Penelitian yang sudah dilakukan tersebut hanya berfokus pada uji antibakteri, namun belum sampai pada identifikasi dan karakterisasi senyawa aktifnya.

Penelitian efek farmakologi belimbing wuluh telah dilaporkan oleh Savitri (2014) bahwa hasil skrining ekstrak etanol daun Belimbing wuluh. memiliki kandungan kimia meliputi tannin, flavonoid, dan saponin sedangkan untuk triterpenoid hasilnya negatif. Konsentrasi 10,5% ekstrak etanol daun *Averrhoa bilimbi L.* efektif sebagai antibakteri pada bakteri bakteri yang menginfeksi saluran akar gigi, walaupun tidak terdapat kandungan daun belimbing wuluh yaitu alkaloid dan steroid/triterpenoid. Sebelumnya penelitian juga pernah dilakukan oleh Hayati, *et al.* (2009) melaporkan bahwa secara kualitatif pengujian fitokimia senyawa tanin terhadap ekstrak aseton-air (7:3) daun Belimbing wuluh dengan reagen FeCl₃, gelatin dan campuran formalin : HCl menunjukkan adanya golongan

senyawa tannin. Ekstrak tannin pada daun Belimbing wuluh mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

Pada penelitian ini, senyawa ekstrak daun Belimbing wuluh akan diuji sebagai senyawa aktif antibakteri terhadap bakteri *Streptococcus mutans* penyebab karies gigi. Hasil ekstrak tersebut akan dilakukan uji daya hambat maksimumnya sehingga diperoleh senyawa aktif antibakteri dengan hasil yang optimum.

B. Dasar teori

1. Karies Gigi

Karies gigi merupakan penyakit yang disebabkan oleh aktivitas metabolisme mikroorganisme yang menyerang enamel, dentin dan sementum. Hal ini dikarenakan aktivitas metabolisme mikroorganisme menghasilkan asam dari fermentasi karbohidrat. Karies ditandai dengan terjadinya hilangnya mineral-mineral (demineralisasi) pada jaringan enamel gigi, dilanjut dengan kerusakan bahan organiknya. Penyakit ini mengakibatkan bakteri masuk ke jaringan enamel gigi, kematian jaringan pulpa, infeksi jaringan periapikal yang menyebabkan nyeri pada gigi (Kidd and Bechal, 1991).

Faktor etiologi terjadinya penyakit karies disebabkan oleh adanya bakteri, substrat, dan kerentanan gigi yang saling berinteraksi. Karies terjadi akibat pembentukan plak oleh bakteri di permukaan gigi yang menyebabkan demineralisasi jaringan gigi pada kondisi asam dengan pH 5 atau lebih kecil. Bakteri penghuni plak gigi memiliki berbagai jenis dan lebih dari 300 macam spesies, namun demikian *Streptococcus mutans* yang merupakan penyebab utama

karies karena sifatnya yang dapat menempel pada email, bersifat asidurik (mampu bertahan dalam lingkungan yang asam), asidogenik (memproduksi asam organik dari karbohidrat), berkembangbiak baik di lingkungan kaya sukrosa, dan menghasilkan bakteriosin yang dapat membunuh mikroorganisme kompetitornya (Putri, *et al.*, 2010).

2. Tanaman Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.)



Gambar 2.1 Tanaman Belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.).

Belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) merupakan tumbuhan yang menyukai tempat tumbuh yang tidak ternaungi dan cukup lembab, Termasuk kelompok pohon kecil, tingginya bisa mencapai 10 meter dengan ukuran batang tidak terlalu besar. Batang kasar dan biasanya benjol-benjol. Percabangan sedikit dengan arah pertumbuhan agak condong ke atas. Daun termasuk daun majemuk menyirip ganjil dengan 21-45 pasang anak daun. Anak daun bertangkai pendek, berbentuk bulat telur sampai jorong, ujung runcing, pangkal membulat, tepi rata, panjang 2-10 cm, lebar 1-3cm, berwarna hijau, permukaan bawah hijau muda.

Perbungaan majemuk tersusun dalam Malai (ibu tangkai yang bercabang), berkelompok, keluar dari batang atau percabangan besar, bunga kecil-kecil berbentuk bintang berwarna ungu kemerahan. Buah berupa buni, bentuk bulat lonjong bersegi panjang 4-6.5 cm, berwarna hijau kekuningan, berair banyak jika masak, rasa asam, bentuk biji bulat telur dan gepeng (Kinho, *et al.*, 2011)

Belimbing wuluh memiliki nama asing Huang gua suhu (Cina), Cucumber Three, Three sorrel (India), Talingping (Thailand), sedangkan di Indonesia disebut Blimbing buloh (Bali), Belimbing wuluh (Jawa tengah), Bhalimbhing bulu (Madura), Belimbing asem (Melayu), Limbi (Bima), Limeng (Aceh), Bainang (Makassar), dan Uteke (Irian) (Kinho, *et al.*, 2011). Belimbing wuluh memiliki kegunaan sebagai obat nyeri, melancarkan keluarnya empedu, antiradang, meluruhkan kencing (diuretic), darah tinggi dan sakit gigi. Herbal belimbing wuluh memiliki kandungan kimia seperti flavonoid, saponin, terpenoid, tannin, glukoside, kalsium oksalat, sulfur, asam format dan peroksidase (Savitri, 2014., Kinho, *et al.*, 2011., Hayati, *et al.*, 2010).

3. Metabolit Sekunder

Metabolit sekunder merupakan produk metabolisme unik yang ditemukan pada suatu taksonomi organisme tertentu. Metabolit sekunder bukan merupakan senyawa esensial untuk kehidupan, pertumbuhan organisme, dan dibiosintesis dari satu atau lebih metabolit primer dengan jalur biosintesis yang berbeda. Metabolit sekunder memiliki fungsi sebagai pertahanan terhadap hama dan penyakit, atraktan, dan signal untuk komunikasi antar organisme penghasil (Raharjo, 2013).

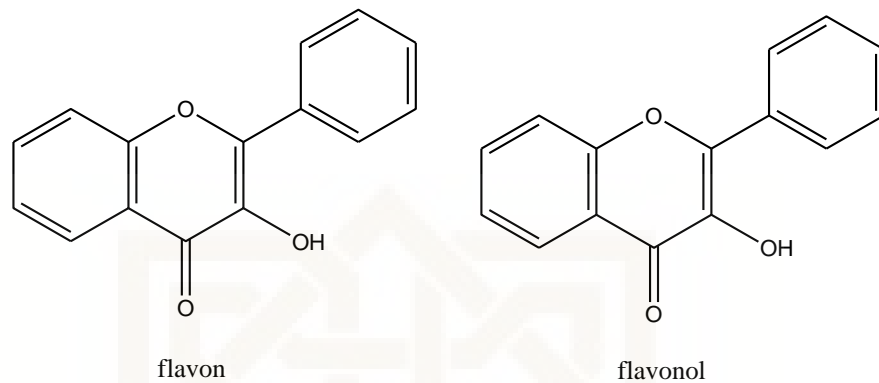
Metabolit sekunder tidak dapat dikelompokkan secara rigid seperti metabolit primer, namun demikian pengelompokan dapat didasarkan pada jalur biosintesis yang membentuk senyawa tersebut. Biosintesis metabolit sekunder dapat melalui 4 jalur yaitu: jalur asetat (*acetate pathway*), jalur shikimat (*shikimate pathway*), jalur mevalonat (*mevalonate pathway*), dan jalur metileritritol fosfat (*methylerythritol phosphate pathway*) Dewick (2002). Keempat jalur biosintesis tersebut akan menghasilkan berbagai macam metabolit sekunder. Senyawa-senyawa yang tergolong dalam metabolit sekunder antara lain:

a. Flavonoid

Flavonoid merupakan metabolit sekunder yang secara kimia memiliki struktur dasar dengan 3 atom karbon diantara dua cincin aromatis ($C_6-C_3-C_6$). Nama flavonoid berasal dari kata flavon yaitu anggota flavonoid yang banyak terdapat pada tanaman yang terdistribusi pada bagian batang, daun, bunga, buah, akar, biji dan kulit kayu. Flavonoid banyak terdapat di alam dan bertanggung jawab dalam pembentukan warna daun, bunga, buah pada tanaman. Keberadaan flavonoid pada tanaman dapat memberikan efek proteksi terhadap jamur dan paparan sinar UV-B (Raharjo, 2013).

Flavonoid dibiosintesis melalui jalur asam shikimat dan jalur poliketida. Jalur asam shikimat menghasilkan fenil propanoid dalam bentuk 4 hidroksisinaoil-CoA yang berfungsi sebagai starter pada jalur poliketida. Flavonoid digolongkan berdasarkan cincin heterosiklik, oksigen tambahan dan gugus hidroksi yang tersebar menurut pola penyebarannya (Robinson, 1995). Berdasarkan kerangka karbon strukturnya flavonoid dibagi menjadi 6 sub kelompok utama yaitu flavon,

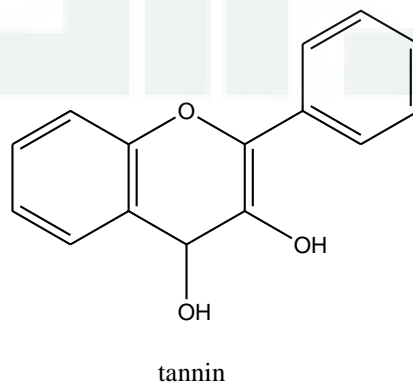
flavonol, flavanon, flavanol, isoflavon, dan antosianidin. Struktur keenam kelompok flavonoid dapat dilihat pada Gambar 2.11.



Gambar 2.2. Struktur beberapa jenis senyawa flavonoid

b. Tannin

Tannin merupakan golongan senyawa aktif tumbuhan yang bersifat fenol mempunyai rasa sepat dan mempunyai kemampuan menyamak kulit. Secara kimia tanin dibagi menjadi dua golongan, yaitu tanin terkondensasi atau tannin katekin dan tanin terhidrolisis (Robinson, 1995). Tanin terkondensasi terdapat dalam paku-pakuan, gimnospermae dan angiospermae, terutama pada jenis tumbuh-tumbuhan berkayu. Tannin terhidrolisis penyebarannya terbatas pada tumbuhan berkeping dua (Harborne, 1984).



Gambar 2.3. Struktur tannin (Harborne, 1984)

c. Terpenoid

Terpenoid merupakan senyawa yang diturunkan dari kombinasi dua atau lebih satuan isoprena. Isoprena merupakan hidrokarbon dengan 5 atom karbon yang dikenal dengan nama 2- metil 1,3- butadiena. Terpenoid ditemukan hampir pada semua tanaman tinggi dan terdapat pada mikroba, jamur dan lumut. Terpenoid dibiosintesis melalui jalur mevalonat dengan kerangka dasar asetil-CoA. Klasifikasi terpenoid Berdasarkan kerangka ulangan isoprena dapat dilihat pada Tabel 2.1 (Sarker *and* Nahar, 2007).

Tabel 2.1. Klasifikasi terpenoid, contoh dan sumber tumbuhan

Tipe Terpenoid	Jumlah Atom C	Contoh	Sumber
Hemiterpenoid	5	asam tiglat	<i>Geranium sp.</i>
Monoterpenoid	10	Geraniol	<i>Cymbopogon citratus</i>
Seskuiterpenoid	15	Zingiberena	<i>Zingiber officinalis</i>
Diterpenoid	20	asam agatat	<i>Agathis alba</i>
Sesterpenoid	25	Ofiobolena	<i>Helminthosporium maydis</i>
Triterpenoid	30	Stigmasterol	<i>Flycine max</i>
Tetraterpenoid	40	β -karotena	<i>Daucus carota</i>
Politerpenoid	< 40	Solanesol	<i>Taraxacum sp.</i>

(Robinson, 1995)

Senyawa terpenoid dengan berat molekul tinggi telah dilaporkan memiliki aktivitas biologi yang menarik seperti asam boswelik sebagai antiinflamasi dan antiarthritik, plisitaksel dan taksol sebagai antikanker, artemisinin sebagai antimalaria, brusatol sebagai kemopreventif, gibrelin sebagai hormon pertumbuhan tanaman kkasbena sebagai antimikroba pada tanaman jarak (*Ricinus communis*) akibat adanya infeksi jamur *Rhizopus stolonifer*.

d. Asam Lemak

Asam-asam lemak yang ditemukan di alam umumnya merupakan asam-asam monokarboksilat dengan rantai yang tidak bercabang dan mempunyai jumlah atom karbon genap. Berdasarkan ada tidaknya ikatan rangkap pada struktur dasar rantai hidrokarbon suatu asam lemak, maka asam lemak dapat dibagi menjadi dua golongan yaitu asam lemak jenuh dan asam lemak tidak jenuh. Asam lemak jenuh tidak memiliki ikatan rangkap pada rantai hidrokarbonnya dan umumnya bersifat semi padat sampai padat terutama asam-asam lemak jenuh dengan jumlah karbon di atas 12. Sementara asam-asam lemak tidak jenuh memiliki minimal satu ikatan rangkap yang selanjutnya sangat berbeda sifat kimianya dengan perbedaaan jumlah dan posisi ikatan rangkapnya (Murhadi, 2009).

Asam lemak tidak jenuh yang terdapat secara alami berbentuk *cis* sehingga molekulnya “bengkok” pada ikatan rangkap tersebut (Gurr, 1992). Secara keseluruhan asam-asam lemak alami mempunyai jumlah atom karbon genap mulai dari C₂ sampai C₃₀ (Winarno, 1984), baik dalam bentuk bebas (asam lemak bebas) ataupun dalam bentuk ester dengan gliserol (gliserida). Asam-asam lemak yang paling dominan bersumber dari tanaman adalah: asam palmitat (16:0), asam stearat (18:0), asam oleat (18:1), dan asam laurat (12:0) (Murhadi, 2009).

Secara umum aksi penghambatan pertumbuhan bakteri oleh asam-asam organik erat kaitannya dengan kemampuan asam-asam organik yang tidak terdisosiasi untuk menembus membran sel bakteri, lalu mengganggu

keseimbangan asam-basa, proton dan produksi energi di dalam sel bakteri (Doores *in Branen and Davidson*, 1983).

4. Ekstraksi Metabolit Sekunder

Proses ekstraksi merupakan cara pemisahan zat terlarut melalui dua buah pelarut (biasanya air) yang dapat melarutkan zat tersebut namun keduanya tidak dapat saling melarutkan (*immiscible*). Sample dilarutkan dalam 'refinat' yang ada dalam kotak 'ekstraktan' sehingga terjadi perpindahan molekul zat terlarut karena perbedaan kelarutan didalam kedua jenis pelarut (Wonorahardjo, 2013).

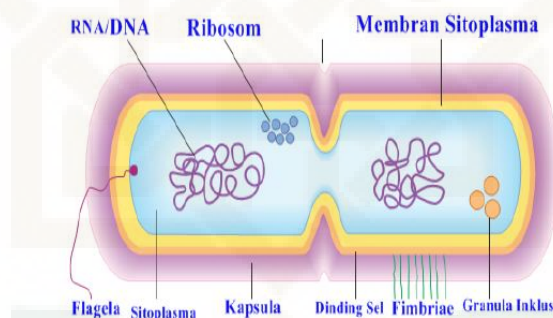
Lamanya waktu yang digunakan untuk ekstraksi memberikan kontribusi yang cukup besar terhadap keberhasilan ekstraksi. Kenaikan waktu proses ekstraksi menghasilkan kenaikan rendemen pada ekstrak yang dihasilkan. Lamanya waktu akan mempermudah penetrasi pelarut ke dalam sampel, kelarutan komponen-komponen senyawa yang diekstrak berjalan dengan perlahan sebanding dengan kenaikan waktu (Irawan, 2010). Penggunaan suhu ekstraksi 50°C menghasilkan ekstrak yang optimum dibandingkan suhu 40°C dan 60°C (Wibowo, 2013). Ekstraksi akan lebih cepat apabila dilakukan pada suhu tinggi, akan tetapi dapat merusak komponen ekstraktan (Voight, 1994).

Adapun beberapa metode ekstraksi yang umum digunakan yaitu maserasi, perkolasi, dan sokhletasi. Maserasi merupakan proses ekstraksi dengan cara merendam sampel serbuk dari bahan alam di dalam pelarut sampai meresap dan melunakkan susunan sel yang mengakibatkan zat yang terkandung di dalam bahan alam tersebut terlarut di dalam pelarut (Ansel, 1989). Proses maserasi dilakukan pada suhu ruangan dan perlu dilakukan penggojokan atau pengadukan sesekali

(Senja, 2014). Metode maserasi ini mempunyai keuntungan yaitu alat yang sederhana dan mudah dilakukan (Damayanti, 2012).

5. Bakteri dan Bakteri Uji

Bakteri merupakan mikroorganisme prokariotik bersel tunggal berukuran 0,5-10 μm dan memiliki berbagai macam bentuk, yaitu: bola, batang, spiral, dan elips (Eliot, *et al.*, 2011). Bakteri tersusun atas dinding sel dan isi sel, berdasarkan komponen penyusun dinding sel bakteri digolongkan menjadi bakteri gram positif dan gram negatif. Struktur umum morfologi bakteri disajikan pada Gambar 2.4 berikut ini:



Gambar 2.4. Morfologi bakteri (Eliot, *et al.*, 2011)

Perkembangbiakan bakteri melalui pembelahan sel, pada media yang sesuai bakteri dalam waktu 24 jam dapat mencapai 10-15 milyar sel per milliliter (Pelczar *and* Chan, 1986).

Bakteri memiliki taksonomi yang berbeda-beda dan dapat dikelompokkan berdasarkan morfologi, pewarnaan terhadap zat warna, dan sifat biokimia (fisiologis), namun secara garis besar bakteri dapat dikelompokkan berdasarkan komponen penyusun dinding sel bakteri menjadi dua yaitu bakteri gram positif dan bakteri gram negatif. Bakteri gram negatif memiliki dinding sel yang lebih kompleks dibandingkan

dengan bakteri gram positif. Perbedaan bakteri gram positif dan negatif disajikan pada Tabel 2.2.

Tabel 2.2. Perbedaan bakteri gram positif dan negatif

Ciri-Ciri	Perbedaan Relatif Bakteri	
	Gram Positif	Gram Negatif
struktur dinding sel	tebal (15 -80 nm) berlapis tunggal (monolayer)	tipis (10 -15 nm) berlapis tiga (multilayer)
komposisi dinding sel	kandungan lipid rendah (14%) peptidoglikan ada sebagai lapisan tunggal; komponen utama merupakan lebih dari 50% berat kering pada beberapa sel bakteri. memiliki asam teikoat	kandungan lipid tinggi (11-22%) peptidoglikan ada di dalam lapisan kaku sebelah dalam; jumlahnya sedikit; merupakan sekitar 10% berat kering tidak memiliki asam teikoat
kerentanan terhadap penisilin	lebih rentan	kurang rentan
pertumbuhan pada zat warna kristal violet	pertumbuhan dihambat dengan nyata	Pertumbuhan tidak dihambat nyata
persyaratan nutrisi resistensi terhadap gangguan fisik	relatif rumit	relatif sederhana
struktur dinding sel	lebih resisten	kurang resisten
struktur dinding sel	tebal (15 -80 nm) berlapis tunggal (monolayer)	tipis (10 -15 nm) berlapis tiga (multilayer)

(Pelczar and Chan, 2007).

Bakteri uji *Streptococcus mutans* merupakan bakteri gram positif, bersifat non motil (tidak bergerak) dan tidak membentuk spora dan rata-rata berbentuk rantai dari dua atau lebih kokus. Pada media *Brain Heart Infusion* bakteri *Streptococcus* tumbuh membentuk rantai panjang, namun pada media agar akan membentuk rantai pendek (Ghee, 1982).

Streptococcus mutans memiliki bentuk bulat atau oval dan tersusun dalam rantai. Bakteri ini memiliki diameter berkisar 0,5-7,5 μm . *Streptococcus mutans* tumbuh optimum pada suhu 37°C dalam suasana fakultatif anaerob dengan sedikit CO₂ dan dapat bersifat α -hemolisis atau non hemolisis pada agar darah (Whitman, 2009).

Klasifikasi bakteri *Streptococcus mutans* adalah sebagai berikut (Whitman, 2009):

Kingdom : Monera
Divisi : Firmicutes
Class : Bacilli
Order : Lactobacillales
Family : Streptococcaceae
Genus : Streptococcus
Species : *Streptococcus mutans*

Streptococcus mutans pertama kali diisolasi oleh Clark tahun 1924 dari lesi karies manusia dan kasus infeksi endokarditis. Bakteri jenis ini dinamakan mutan karena fakta morfologi sel yang dapat kehilangan kokus dan sering terlihat batang pendek (Marsh and Martin, 2009).

Streptococcus mutans dapat menghasilkan polisakarida ekstraseluler (glukan dan fruktan) yang tidak larut dalam air dari fermentasi sukrosa dengan bantuan enzim glukosiltransferase dan fruktosiltransferase. *Streptococcus mutans* bersifat asidogenik yang dapat menghasilkan asam dari makanan yang mengandung karbohidrat dan juga bersifat asidurik yang mampu bertahan dan berkembang biak dalam suasana asam hingga pH 4,5. Asam yang paling banyak dihasilkan adalah asam laktat, selain itu juga ada asam piruvat, asam asetat, asam propionat, dan asam formiat (Putri, *et al.*, 2009).

6. Antibakteri dan Uji Aktivitas Antibakteri

Antibakteri adalah suatu zat yang dapat menekan pertumbuhan atau membunuh bakteri. Antibakteri memiliki 2 macam tipe berdasarkan cara kerja terhadap bakteri uji yaitu antibakteri spektrum luas yang mampu menekan pertumbuhan atau membunuh bakteri gram positif dan negatif dan spektrum

sempit mampu menekan pertumbuhan atau membunuh bakteri gram positif atau negatif (Ryan *and* Ray, 2004).

Setiap jenis antibakteri memiliki mekanisme tersendiri dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Mekanisme kerja antibakteri adalah sebagai berikut:

a. Merusak Dinding Sel

Bakteri memiliki lapisan luar yang kaku disebut dinding sel yang dapat mempertahankan bentuk bakteri dan melindungi membran protoplasma di bawahnya. Struktur dinding sel dapat dirusak dengan cara menghambat pembentukannya atau mengubahnya setelah selesai terbentuk. Antibiotik yang bekerja dengan mekanisme ini adalah penisilin (Jawetz, *et al.*, 2001).

b. Mengubah Permeabilitas Sel

Membran sitoplasma mempertahankan bahan tertentu di dalam sel serta mengatur aliran keluar masuknya bahan lain. Membran memelihara integritas komponen seluler. Kerusakan pada membran ini akan mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan sel atau matinya sel. Polimiksin bekerja dengan merusak struktur dinding sel dalam kemudian antibiotik tersebut bergabung dengan membran sel sehingga menyebabkan disorientasi komponen lipoprotein serta mencegah berfungsinya membran sebagai perintang osmotik (Pelczar *and* Chan, 1988).

c. Mengubah Molekul Protein dan Asam Nukleat

Hidup suatu sel bergantung pada terpeliharanya molekul protein dan asam nukleat dalam keadaan alamiahnya. Suatu antibakteri dapat mengubah keadaan ini dengan mendenaturasikan protein dan asam nukleat sehingga merusak sel tanpa

dapat diperbaiki lagi. Salah satu antibakteri yang bekerja dengan cara mendenaturasi protein dan merusak membran sel adalah senyawa turunan fenolik (Pelczar *and* Chan, 1988).

d. Menghambat Sintesis Asam Nukleat dan Protein

DNA, RNA, dan protein memegang peranan penting di dalam proses kehidupan normal sel. Hal ini berarti bahwa gangguan apapun yang terjadi pada pembentukan atau pada fungsi zat-zat tersebut dapat mengakibatkan kerusakan total pada sel. Tetrasiklin merupakan salah satu antibiotik yang dapat menghambat sintesis protein dengan cara menghalangi terikatnya RNA pada ribosom selama pemanjangan rantai peptida (Pelczar *and* Chan, 1988).

7. Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri dengan metode *Disc Diffusion* (Tes Kirby-Beuer). digunakan untuk menguji aktivitas agen antibakteri. Piringan yang berisi agen antibakteri diletakkan pada media agar yang telah ditanami bakteri, kemudian antibakteri akan berdifusi pada media agar tersebut. Daya hambat pertumbuhan antibakteri dapat terlihat pada zona bening yang terbentuk di sekeliling cakram (Pratiwi, 2008).

Ada beberapa faktor yang harus diperhatikan dalam metode difusi. Faktor-faktor tersebut antara lain:

- a. Pra difusi, perbedaan waktu pra difusi mempengaruhi jarak difusi dari zat uji yaitu difusi antar pencadang.
- b. Ketebalan media agar, hal ini penting untuk memperoleh sensitivitas yang optimal. Perbedaan ketebalan media agar dapat mempengaruhi difusi dari zat

uji ke dalam agar sehingga akan mempengaruhi diameter zona hambat. Semakin tebal media yang digunakan, semakin kecil diameter zona hambat yang terjadi.

- c. Kerapatan inokulum, ukuran inokulum merupakan faktor terpenting yang mempengaruhi lebar zona hambat, jumlah inokulum yang lebih sedikit menyebabkan obat dapat berdifusi lebih jauh, sehingga zona hambat yang dihasilkan lebih besar, sedangkan jika jumlah inokulum lebih besar maka akan dihasilkan zona hambat yang kecil.
- d. Komposisi media agar, perubahan komposisi media dapat merubah sifat media sehingga jarak difusi berubah. Hal ini akan mempengaruhi aktivitas beberapa bakteri, kecepatan difusi antibakteri, dan kecepatan pertumbuhan bakteri.
- e. Suhu inkubasi, kebanyakan bakteri tumbuh baik pada suhu 37°C.
- f. Waktu inkubasi disesuaikan dengan pertumbuhan bakteri karena luas zona hambat ditentukan beberapa jam pertama, setelah diinokulasikan pada media agar, maka zona hambat dapat diamati segera setelah adanya pertumbuhan bakteri.
- g. Pengaruh pH, adanya perbedaan pH media yang digunakan dapat menyebabkan perbedaan jumlah zat uji yang berdifusi. pH juga menentukan jumlah molekul zat uji yang mengion. Selain itu, pH berpengaruh terhadap pertumbuhan bakteri (Wattimena, *et al.*, 1991).

8. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan metode pemisahan fisikokimia yang cocok untuk analisis senyawa kimia di laboratorium. Pemisahan

KLT menggunakan fase diam dan fase gerak. Fase diam yang umum digunakan adalah silika gel, alumina, keiselguhr, poliamida, selulosa dan turunannya. KLT merupakan kromatografi planar karena teknik analisisnya menggunakan fase diam berupa lempengan yang datar. Fase diam dilapiskan pada penyangga plat gelas (lempeng kaca), logam (aluminium), atau lapisan yang cocok (Stahl, 1985). Fase gerak yang digunakan umumnya merupakan pelarut organik atau bisa juga campuran pelarut organik dengan kepolaran pelarut dibuat bertingkat dari nonpolar hingga polar.

Kromatografi lapis tipis merupakan analisis cepat untuk pemisahan campuran senyawa menjadi senyawa yang lebih sederhana dengan menggunakan sedikit bahan, baik penyerap maupun cuplikan (Gritter, *et al.*, 1991). Kromatografi lapis tipis dapat digunakan untuk tujuan kualitatif (identifikasi senyawa) dan preparatif (penentuan fase gerak), KLT kualitatif digunakan untuk menganalisis senyawa-senyawa organik dalam jumlah kecil (misal menentukan jumlah kumpulan dalam campuran). Sedangkan KLT preparatif digunakan untuk menentukan pelarut yang tepat untuk pemisahan dengan kromatografi kolom (Townshend, 1995).

Yuliani (2003) menggunakan KLT untuk menentukan fasa gerak yang cocok dalam memisahkan senyawa tanin dari 3 daun jambu biji yang berbeda dan diperoleh fase gerak terbaik yaitu menggunakan fase gerak (eluen) toluena: etil asetat (3:1). Pada penelitian Hayati, *et al.* (2010) dalam menentukan fase gerak untuk memisahkan senyawa dari ekstrak daun Belimbing wuluh menggunakan KLT dan diperoleh eluen terbaik adalah *n*-butanol; asam asetat; air (BAA). Pada

penelitian ini juga dilakukan hal yang sama untuk menentukan fase gerak yang akan digunakan untuk memisahkan senyawa dari ekstrak daun Belimbing wuluh.

Identifikasi dari senyawa-senyawa yang terpisah pada lapisan tipis dapat dilakukan dengan menggunakan deteksi UV, fluoresensi, pereaksi warna dan nilai Rf. Nilai Rf didefinisikan sebagai berikut :

$$\text{Nilai Rf} = \frac{\text{jarak pelarut}}{\text{jarak noda dari titik asal}}$$

Nilai Rf untuk senyawa-senyawa murni dapat dibandingkan dengan nilai Rf dari standar. Nilai Rf yang diperoleh hanya berlaku untuk campuran tertentu dari pelarut dan penyerap yang digunakan (Sastrohamidjojo, 2005).

9. Kromatografi Kolom Vakum (KKV)

Kromatografi Kolom Vakum (KKV) merupakan salah satu metode fraksinasi yaitu dengan memisahkan ekstrak menjadi fraksi-fraksinya yang lebih sederhana. Pemisahan tersebut memanfaatkan kolom yang berisi fasa diam dan aliran fasa geraknya dibantu dengan pompa vakum. Fasa diam yang digunakan dapat berupa silika gel atau alumunium oksida (Ghisalberti, 2008).

Fasa diam yang digunakan dalam KKV dikemas dalam Kolom. Proses penyiapan fasa diam dalam kolom terbagi menjadi dua macam, yaitu dengan cara basah dan cara kering (Sarker, *et al.*, 2006). Pada Penelitian ini dilakukan dengan cara basah yaitu dengan cara melarutkan fasa diam dalam fasa gerak yang akan digunakan pertama kali. Kemudian dimasukkan ke dalam kolom dan dibuat merata. Menurut Sarker, *et al.* (2006) fase gerak dibiarkan mengalir hingga terbentuk lapisan fasa diam yang tetap dan rata kemudian aliran dihentikan.

Preparasi sampel yang akan dielusi dengan KKV juga memiliki berbagai metode seperti preparasi pada fase diam. Metode tersebut yaitu dengan cara basah dan cara kering (Canell, 1998). Sedangkan dalam penelitian ini dilakukan dengan cara kering. Cara kering dilakukan dengan mencampurkan sampel dengan sebagian kecil fase diam yang akan digunakan hingga terbentuk serbuk. Campuran tersebut diletakkan dalam kolom yang telah terisi dengan fasa diam dan ditutup kembali dengan fase diam yang sama (Sarker, *et al.*, 2006).

10. Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC-MS)

Gas Chromatography–Mass Spectrometry atau GC-MS merupakan metode pemisahan senyawa organik yang menggunakan dua metode analisis senyawa yaitu *Gas Chromatography* untuk menganalisis jumlah senyawa secara kuantitatif (berat molekul dan limpahan relatif) dan *Mass Spectrometry* untuk menganalisis struktur molekul suatu analit (Sastrohamidjojo, 2005). Menurut Wonohardjo (2013) analisis bahan-bahan alam sering dilakukan menggunakan kromatografi gas, akan tetapi analisis tersebut dapat disempurnakan apabila dilanjutkan dengan metode *Mass Spectrometry* (MS).

Prinsip kerja dari alat GC-MS menurut Sastrohamidjojo (2005) yaitu dengan memisahkan komponen-komponen dari suatu cuplikan kolom yang selanjutnya akan masuk ke dalam *Mass Spectrometry*. Di dalam *Mass Spectrometry* cuplikan ditembaki dengan berkas elektron dan diubah menjadi ion-ion muatan positif yang bertenaga tinggi dan pecah menjadi ion-ion yang lebih kecil, lepasnya elektron dari molekul atau komponen-komponen menghasilkan radikal kation.

Ion-ion molekul, ion-ion pecahan, dan ion-ion radikal pecahan dipisahkan oleh ion pembelokan dalam medan magnet yang berubah sesuai dengan massa dan muatannya. Perubahan tersebut menimbulkan arus (arus ion) pada kolektor yang sebanding dengan limpahan relatifnya. Kemudian dicatat sebagai spektra massa yang merupakan gambaran antara limpahan relatif dengan rasio massa/muatan (m/e) (Sastrohamidjojo, 2005).



BAB III METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Juni-November 2015 di Laboratorium kimia, Laboratorium terpadu UIN Sunan Kalijaga. Identifikasi senyawa aktif menggunakan GC-MS dilakukan di Laboratorium Farmasi UII.

B. Alat-alat Penelitian

1. Alat

Alat-alat yang digunakan adalah gelas beker, tabung reaksi, labu ukur 10 mL, pipet ukur 1 mL, 5 mL, 10 mL, cawan penguapan, jarum ose, oven (Heraeus UT 6120), satu set Kromatografi Kolom Vakum, neraca analitik (OHAUS AR 2140), *laminar air flow* (Esco EN 1822.1), *rotary evaporator* (Heidolph 2), jangka sorong (Prohex 150 mm), lampu UV λ 254 nm dan λ 366 (Herolab UV-4 SL), mikropipet 5-200 μ L (Socorex), inkubator (Heareus B 6760), dan autoklaf (ASTECLA) dan satu set alat *Gas Chromatography–Mass Spectrometry* (GC-MS) (Shimadzu GC-MS-QP2010 SE).

2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu daun Belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*), *n*-heksana, etil asetat, metanol, silika gel (*type 60*), plat silika gel F₂₅₄, isolat bakteri *S. mutans* yang diperoleh dari Fakultas Kedokteran Gigi UGM, dan yang terakhir media pertumbuhan bakteri *Nutrient Agar* (NA).

C. Prosedur Penelitian

1. Persiapan Sampel dan Maserasi

Sampel daun Belimbing wuluh dicuci bersih pada air mengalir, selanjutnya diangin-anginkan sampai kering, kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 40°C. Sampel daun Belimbing wuluh yang sudah kering kemudian dihaluskan dengan blender hingga diperoleh serbuk daun Belimbing wuluh.

Proses maserasi dilakukan dengan diambil 250 gram daun Belimbing wuluh direndam dengan 2 L *n*-heksana selama 24 jam, kemudian hasil maserasi disaring dan pelarut dalam filtrat diuapkan dengan *rotary evaporator*. Residu yang diperoleh kemudian direndam kembali dengan pelarut *n*-heksana hingga filtrat yang diperoleh bening, pelarut hasil filtrat diuapkan dengan *evaporator*. Residu hasil ekstrak daun Belimbing wuluh pelarut *n*-heksana dikeringkan kemudian direndam dengan pelarut etil asetat selama 24 jam dengan perlakuan sama seperti maserasi dengan *n*-heksana. Residu hasil ekstrak daun Belimbing wuluh pelarut etil asetat dikeringkan kemudian direndam dengan pelarut metanol selama 24 jam dan perlakuan yang sama seperti maserasi dengan pelarut *n*-heksana dan etil asetat. Hasil ekstrak daun Belimbing wuluh ketiga pelarut ditimbang dan dihitung jumlah rendemen.

2. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Belimbing Wuluh

a. Sterilisasi Alat

Semua Alat yang akan digunakan untuk uji aktivitas antibakteri terlebih dahulu disterilisasikan di dalam alat autoklaf pada suhu 120°C selama 60 menit.

b. Pembuatan Media Bakteri

Media yang digunakan adalah media *Nutrient Agar* (NA) yang terdiri atas *Nutrient Broth* (NB) 4 dan agar 10 gram. Media NA sebanyak 14 gram dimasukkan ke dalam gelas erlenmeyer dan ditambahkan 500 mL aquades selanjutnya dipanaskan hingga mendidih. Media yang telah mendidih selanjutnya disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 125°C, tekanan 2.26 atm selama 60 menit.

c. Peremajaan Bakteri

Peremajaan bakteri *S. mutans* dilakukan dengan pemindahan bibit koloni di media yang lama ke media yang baru dengan cara diambil satu ose bakteri pada media lama dan digoreskan pada media NA yang dilakukan secara aseptis, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

d. Uji Aktivitas Antibakteri Metode *Disc Diffusion*

Sebanyak 15 ml media NA yang sudah steril dituangkan ke dalam cawan petri dan didiamkan sebentar hingga memadat. Bakteri yang telah diremajakan diambil dengan kapas lidi yang telah steril, kemudian dioleskan merata pada cawan petri. Cakram kertas diameter 5 mm yang telah ditetesi 15 µL ekstrak *n*-heksana, etil asetat, metanol daun Belimbing wuluh dengan berbagai variasi konsentrasi ditempelkan pada petri dish yang telah diinokulasi bakteri uji. Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan tiga kali ulangan, kemudian diinkubasi selama 24 jam suhu 37°C. Aktivitas antibakteri diperoleh dengan mengukur zona bening yang terbentuk disekeliling *paper disc* pada media agar menggunakan jangka sorong.

e. Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)

Konsentrasi terkecil dari ekstrak daun Belimbing wuluh yang masih mampu menghambat bakteri dijadikan sebagai nilai KHM.

3. Pemisahan Ekstrak Teraktif Daun Belimbing Wuluh

a. Pemilihan Fase Gerak

Ekstrak teraktif dianalisis menggunakan KLT untuk mengetahui pemisahan senyawa dengan pelarut tunggal maupun campuran (fase gerak). Pelarut tunggal digunakan *n*-heksana, etil asetat dan metanol, sedangkan pelarut campuran digunakan *n*-heksana: etil asetat dan etil asetat: metanol. Bercak yang dihasilkan kemudian diamati di bawah sinar UV dengan λ 254 nm. Pelarut atau campuran pelarut yang menghasilkan pemisahan paling baik pada KLT digunakan pada fraksinasi ekstrak teraktif daun Belimbing wuluh dengan Kromatografi Kolom Vakum (KKV).

b. Fraksinasi Ekstrak Teraktif Daun Belimbing Wuluh

Fraksinasi ekstrak teraktif daun Belimbing wuluh dilakukan dengan metode Kromatografi Kolom Vakum (KKV). Fase diam yang digunakan adalah kieselgel G (type 60) yang telah diaktivasi dengan memanaskannya pada suhu 110°C selama 1 jam. Preparasi kolom dilakukan dengan cara basah. Sebanyak 35 gram kieselgel G (type 60) dimasukkan dalam kolom kemudian diratakan.

Preparasi sampel dilakukan dengan cara kering yaitu dengan mencampurkan 3 gram ekstrak teraktif daun Belimbing wuluh dengan 5 gram kieselgel G (type 60). Campuran diaduk hingga membentuk serbuk. Sampel yang

telah tercampur menjadi serbuk kemudian dimasukkan di atas fase diam yang telah dipreparasi dalam kolom.

Fase gerak yang digunakan dalam Kromatografi Kolom Vakum (KKV) adalah *n*-heksana, *n*-heksana; etil asetat, etil asetat; metanol, dan metanol yang kenaikan kepolarannya dibuat bergradien. Setiap elusi digunakan eluen 50 mL Fase gerak yang digunakan pada KKV disajikan pada Tabel 3.1 berikut ini.

Tabel 3.1. Fase Gerak Kromatografi Kolom Vakum (KKV)

No	Pelarut	Perbandingan
1	<i>n</i> -heksana	
2	<i>n</i> -heksana : etil asetat	9 : 1
3	<i>n</i> -heksana : etil asetat	8 : 2
4	<i>n</i> -heksana : etil asetat	7 : 3
5	<i>n</i> -heksana : etil asetat	6 : 4
6	<i>n</i> -heksana : etil asetat	5 : 5
7	<i>n</i> -heksana : etil asetat	4 : 6
8	<i>n</i> -heksana : etil asetat	3 : 7
9	<i>n</i> -heksana : etil asetat	2 : 8
10	<i>n</i> -heksana : etil asetat	1 : 9
11	etil asetat	
12	etil asetat : metanol	9 : 1
13	etil asetat : metanol	8 : 2
14	etil asetat : metanol	7 : 3
15	etil asetat : metanol	6 : 4
16	etil asetat : metanol	5 : 5
17	etil asetat : metanol	4 : 6
18	etil asetat : metanol	3 : 7
19	etil asetat : metanol	2 : 8
20	etil asetat : metanol	1 : 9
21	Metanol	

Eluat hasil KKV selanjutnya dilakukan profiling dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) untuk mendapatkan profil KLT-nya. Hasil eluat kemudian dipisahkan dengan cara diuapkan menggunakan cawan penguapan.

4. Uji Antibakteri Fraksi Pemisahan Ekstrak Teraktif Daun Belimbing Wuluh

Paper disc steril (diameter 5 mm) dicelupkan kedalam masing-masing fraksi yang telah diencerkan, dibiarkan mengering dan diletakkan pada *petri dish* yang telah diinokulasi dengan *S. mutans* menggunakan metode *streak*. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Diameter zona bening di sekeliling *paper disc* diukur sebagai zona hambat. Uji aktivitas dilakukan dengan 3 kali pengulangan (*triplo*).

5. Identifikasi Senyawa Aktif Menggunakan GC-MS

Proses identifikasi senyawa dilakukan dengan cara menginjeksi 1 μL sampel fraksi 7 ekstrak etil asetat daun Belimbing wuluh yang sebelumnya telah dilarutkan dengan pelarut etil asetat, ke dalam port injeksi. Uap cuplikan ini akan dibawa oleh eluen gas pembawa, kemudian masuk kedalam kolom kapiler. Selanjutnya, kolom akan memisahkan komponen atau senyawa-senyawa antikanker yang terdapat dalam fraksi tersebut. Selanjutnya, akan dideteksi oleh detektor sehingga dapat dihasilkan suatu data kromatogram yang berasal dari hasil analisis GC dan spektra massa dari hasil analisis MS.

Identifikasi senyawa aktif antibakteri ini dilakukan menggunakan GC-MS-QP2010 SE. Eluen berupa gas helium (He) dengan tekanan 12,0 kPa, aliran total 77,8 mL menit⁻¹. Rentang suhu pada oven yang digunakan yaitu 70° – 320°C (10 menit) dan kenaikan suhu sebesar 10°C per menit dengan mode *split*. Kolom yang digunakan yaitu kolom kapiler berisi fase diam berupa RTX-5MS dengan suhu maksimum kolom 320°C panjang 30 m dan diameter

250 μm . Mode aliran gas pembawa dan komponen yang dipisahkan sebanyak 0,49 mL menit^{-1} dengan kecepatan rata-rata 25,5 cm detik^{-1} .

Komponen yang mengalami pemisahan akan masuk ke dalam alat *Mass Spectrometry* dan akan dideteksi oleh MS. Senyawa dianalisis menggunakan *Electron Impact* (EI) pada rentang massa antara 50 hingga 600 mz^{-1} (Lampiran 6) dan dihasilkan fragmen-fragmen massa spektra yang kemudian dibandingkan dengan spektra massa standar *library* (Wiley7Nist05.L) berdasarkan *Similarity Index* (SI).

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) adalah salah satu jenis tanaman obat yang telah banyak diteliti khasiatnya dan merupakan obat tradisional. Tanaman ini mempunyai kandungan bahan kimia alami yang diketahui mempunyai efek antibakteri (Faharani, 2009). Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Savitri (2014) menunjukkan bahwa ekstrak dari tanaman belimbing wuluh mempunyai khasiat sebagai antibakteri terhadap bakteri *mix* saluran akar gigi. Sehubungan dengan hal tersebut dalam penelitian ini akan dilakukan penelitian lebih lanjut aktivitas antibakteri ekstrak daun Belimbing wuluh dan fraksi-fraksi hasil pemisahan ekstrak paling potensial terhadap bakteri kariogenik *S. mutans* dan identifikasi senyawa aktifnya sebagai senyawa antibakteri.

1. Persiapan sampel




Sampel daun Belimbing wuluh dikeringkan dan dibuat serbuk. Fungsi dari pengeringan yaitu untuk mengurangi kadar air dan dapat disimpan dalam waktu yang cukup lama karena dengan adanya kadar air dapat menyebabkan terjadinya reaksi enzimatis dalam daun yang dapat mengubah susunan senyawanya (Voight, 1994). Penyerbukan dilakukan untuk memperluas permukaan dari sampel sehingga akan mudah bagi pelarut untuk mengikat senyawa yang terdapat dalam sampel (Sarker *et al.*, 2006). Metode pemisahan senyawa dalam sampel menggunakan metode maserasi dilakukan secara bertingkat dengan 3 pelarut.

Maserasi dilakukan bertingkat dengan tujuan metabolit sekunder yang terdapat dalam daun Belimbing wuluh dapat dipisahkan secara maksimal berdasarkan perbedaan tingkat kepolaran senyawanya. Sedangkan untuk pemilihan pelarut, menurut Sarker, *et al.* (2006) didasarkan pada selektivitas masing-masing pelarut dalam mengekstrak senyawa berdasarkan kepolaran, tingkat keamanan dan kemudahan menguap. Kepolaran pelarut pada penelitian ini didasarkan pada sifat kepolaran dari senyawa-senyawa yang berpotensi sebagai senyawa antibakteri seperti flavonoid, tannin, triterpenoid dan asam lemak.

Penelitian yang dilakukan oleh Hayati *et al.* (2010) menyebutkan bahwa flavonoid dan tannin bersifat polar dan larut dalam etanol, sedangkan Sukadana, *et al.* (2008) menyebutkan bahwa triterpenoid bersifat semi polar dan dapat larut pada *n*-heksana dan etil asetat. Kemudian menurut Murhadi (2009) asam lemak bersifat non polar dan larut pada pelarut non polar. Oleh karena itu, pelarut yang digunakan dalam penelitian ini meliputi *n*-heksana (non polar), etil asetat (semi polar), dan metanol (polar). Hasil ekstraksi dengan teknik maserasi disajikan pada Tabel 4.1.

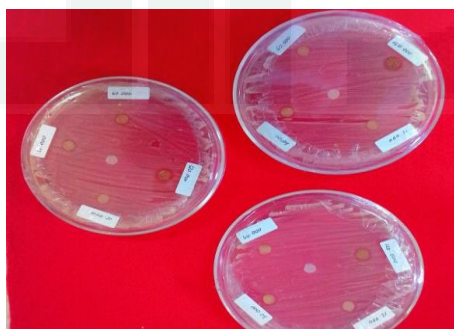
Ekstrak daun Belimbing wuluh yang disajikan pada Tabel 4.1 menunjukkan pelarut metanol memiliki rendemen ekstrak yang lebih banyak dibandingkan dengan dua pelarut lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa dalam ekstrak daun Belimbing wuluh mengandung sebagian besar senyawa yang bersifat polar. Ekstrak yang diperoleh kemudian diuji aktivitas antibakterinya.

Tabel 4.1. Hasil maserasi daun Belimbing wuluh

Ekstrak	Gambar Ekstrak	Berat Ekstrak (Gram)	Rendemen (%)	Warna
<i>n</i> -heksana		12,31	2,46	Hitam kekuningan
Etil asetat		17,23	3,45	Hitam kehijauan
Metanol		48,65	9,73	Cokelat kehitaman

2. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Belimbing Wuluh

Metode yang digunakan dalam uji aktivitas ekstrak daun Belimbing wuluh yaitu menggunakan metode *disc diffusion*. Parameter dalam uji aktivitas antibakteri dilihat dari terlihatnya zona bening yang terdapat disekeliling *paper disc*. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak daun Belimbing wuluh disajikan pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1. Aktivitas antibakteri ekstrak daun Belimbing wuluh pelarut etil asetat ditunjukkan dengan adanya zona bening di sekitar *paper disc* terhadap bakteri *S. mutans*.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan terhadap ekstrak daun Belimbing wuluh pada variasi konsentrasi 10-120 ppm menunjukkan bahwa ekstrak pelarut *n*-heksana dan metanol tidak mampu menghambat bakteri *S. mutans*. Hal ini dibuktikan dengan tidak munculnya zona bening pada sekeliling *paper disc*. Sebaliknya, ekstrak etil asetat menunjukkan adanya potensi dalam menghambat bakteri *S. mutans*. Hal ini dikarenakan pada ekstrak etil asetat daun belimbing wuluh ketika diujikan terhadap bakteri *S. mutans* muncul zona bening yang terlihat di sekitar *paper disc*. Hasil pengujian ekstrak daun Belimbing wuluh dapat dilihat pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2. Diameter zona hambat antibakteri ekstrak daun Belimbing wuluh dari pelarut *n*-heksana, etil asetat dan metanol terhadap bakteri *S. mutans*. Tanda (-) menunjukkan tidak adanya zona hambat disekeliling *paper disc*.

No	Ekstrak	Diameter Zona Hambat
1.	<i>n</i> -heksana	-
2.	Etil asetat	+
3.	Metanol	-

Berdasarkan Tabel 4.2 menunjukkan bahwa dari ketiga ekstrak yang diujikan, ekstrak dari pelarut etil asetat lebih berpotensi sebagai senyawa antibakteri. Hal ini ditandai dengan munculnya zona bening di sekitar *paper disc*. Senyawa antibakteri merupakan senyawa yang dapat masuk ke dalam membran dan dinding sel yang menyebabkan pembentukan sel bakteri menjadi terganggu. ekstrak daun Belimbing wuluh yang memiliki aktivitas antibakteri kemudian ditentukan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) yaitu konsentrasi terendah suatu ekstrak dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Semakin kecil nilai KHM yang diperoleh, menandakan senyawa tersebut cocok digunakan

sebagai senyawa antibakteri. Hasil uji aktivitas antibakteri penentuan KHM ekstrak daun Belimbing wuluh pelarut etil asetat disajikan pada Tabel 4.3.

Tabel 4.3. Hasil penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ekstrak daun Belimbing wuluh pelarut etil asetat.

Konsentrasi (ppm)	Diameter Hambat Minimum (mm)
11	-
12	-
13	-
14	-
15	-
16	-
17	7,3
18	6,25
19	6,3
20	7,5

Berdasarkan Tabel 4.3 terlihat bahwa ekstrak daun Belimbing wuluh pelarut etil asetat memiliki konsentrasi hambat minimum (KHM) pada konsentrasi 17 ppm. Dari hasil penelitian ini, terlihat bahwa konsentrasi 17 ppm merupakan KHM dari ekstrak daun belimbing wuluh pelarut etil asetat. Selanjutnya, dilakukan pemisahan pada ekstrak etil asetat daun belimbing wuluh menjadi fraksi-fraksi yang lebih sederhana dengan Kromatografi Kolom Vakum (KKV).

3. Pemisahan Ekstrak Daun Belimbing Wuluh Pelarut Etil Asetat

Pemisahan ekstrak daun Belimbing wuluh pelarut etil asetat dilakukan dengan metode Kromatografi Kolom Vakum (KKV), KKV merupakan salah satu jenis metode fraksinasi dengan kromatografi kolom menggunakan bantuan pompa vakum untuk mempercepat aliran fase gerak (Sarker *et al.*, 2006). Sebelum melakukan pemisahan dengan KKV, terlebih dahulu dilakukan pemilihan fase gerak menggunakan Kromatografi Lapit Tipis (KLT). Menurut Canell (1998)

dan Sarker *et al.* (2006) pemisahan KLT yang baik dari suatu ekstrak dapat dijadikan dasar pemilihan fase gerak dan fase diam dalam kromatografi kolom.

Pemilihan fase gerak menggunakan KLT dilakukan dengan sistem pelarut tunggal dan sistem pelarut campuran. Pelarut yang digunakan dalam sistem tunggal adalah *n*-heksana, etil asetat, dan metanol. Sedangkan pada sistem campuran yaitu perbandingan antara pelarut *n*-heksana: etil asetat dan etil asetat: metanol. Hasil pengujian ekstrak daun Belimbing wuluh ditunjukkan pada Tabel 4.4.

Tabel 4.4. Hasil KLT ekstrak daun Belimbing wuluh pelarut etil asetat menggunakan plat silika Gel F₂₅₄ dengan berbagai sistem pelarut. Spot dideteksi dengan lampu UV 254 nm.

No	Pelarut	Jumlah Spot	Rasio Eluen	Nilai Rf
1.	<i>n</i> -heksana	-	1	-
2.	Etil asetat	2	1	0,7 0,725
3.	Metanol	1	1	0,725 0,275 0,375 0,475 0,6 0,825 0,875
4.	<i>n</i> -heksana: etil asetat	-	3:1	-
		1	1:3	0,75 0,575 0,725 0,8
		3	2:3	0,775 0,75 0,75 0,75
		1	3:1	0,75 0,75 0,75
5.	Etil asetat: metanol	1	1:3	0,75
		1	2:3	0,75
		2	3:2	0,75 0,875

Berdasarkan Tabel 4.4 menunjukkan bahwa campuran pelarut *n*-heksana: etil asetat (3:1) dapat memisahkan ekstrak daun Belimbing wuluh pelarut etil asetat dengan baik. Hal ini dibuktikan dengan jumlah spot yang dihasilkan yaitu sebanyak 6 spot. Gambar hasil pemilihan fase gerak menggunakan KLT dapat dilihat pada Lampiran 2. Kemudian setelah tahap pemilihan fase gerak dilakukan, dilanjutkan dengan pemisahan ekstrak daun Belimbing wuluh pelarut etil asetat menggunakan KKV.

Preparasi kolom KKV dilakukan dengan teknik basah. Teknik basah dipilih karena untuk menghindari agar tidak terbentuknya gelembung udara dan keretakan pada fase diam di dalam kolom. Gelembung udara dan keretakan pada fase diam sering terjadi apabila menggunakan cara kering. Fase diam teknik basah pada KKV dibuat dengan melarutkan kiesel G (type 60) dengan fase gerak yang pertama kali sehingga berbentuk bubuk. Terbentuknya gelembung udara dan keretakan pada fase diam di dalam kolom mengakibatkan proses pemisahan yang tidak sempurna (Sarker, *et al.*, 2006).

Fase gerak yang digunakan dalam pemisahan ekstrak daun Belimbing wuluh pelarut etil asetat menggunakan KKV dilakukan secara bergradien, yaitu dari pelarut non polar hingga yang paling polar. Hal ini dilakukan dengan harapan dapat memperoleh senyawa campuran yang memiliki tingkat kepolaran yang berbeda-beda (Gritter, *et al.*, 1991).

Pemisahan ekstrak daun Belimbing wuluh pelarut etil asetat menggunakan KKV menghasilkan 21 fraksi. Kemudian dari hasil fraksi tersebut selanjutnya dilakukan pengujian dan ditentukan fraksi mana yang paling potensial dalam

menghambat bakteri dilihat dari diameter zona beningnya. Sebelum dilakukan pengujian, terlebih dahulu dilakukan profiling menggunakan KLT dengan campuran pelarut (fase gerak) *n*-heksana: etil asetat (3:1). Hal ini dilakukan untuk menyederhanakan fraksi yang diperoleh. Fraksi yang memiliki profil identik (memiliki kesamaan spot atau noda) maka disederhanakan menjadi satu fraksi. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa masing-masing fraksi memiliki profil yang berbeda-beda sehingga tidak ada fraksi yang dapat disederhanakan.

4. Uji Antibakteri Fraksi Hasil Pemisahan Menggunakan KKV

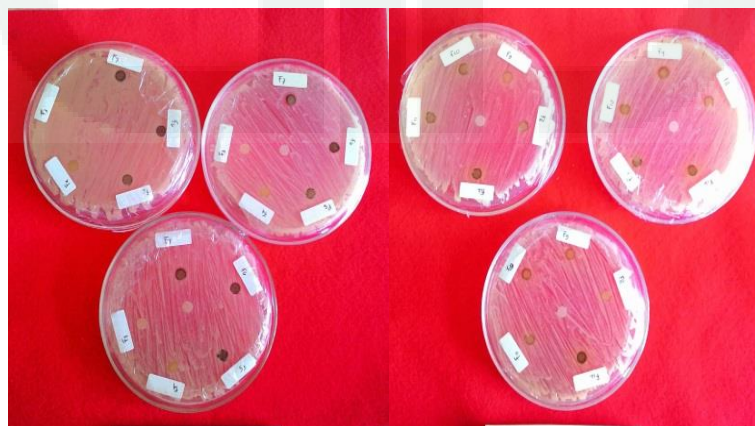
Uji aktivitas antibakteri hasil pemisahan menggunakan KKV dilakukan dengan metode *disc diffusion* pada konsentrasi 17 ppm. Fraksi yang mempunyai diameter zona hambat terbesar merupakan fraksi yang paling potensial sebagai senyawa antibakteri. Uji antibakteri pada fraksi-fraksi hanya dapat dilakukan pada fraksi 3 hingga 20. Hal ini dikarenakan pada fraksi 1, 2, dan 21 tidak berwarna yang menunjukkan bahwa tidak ada senyawa yang ikut terangkut pada ketiga fraksi tersebut. Hasil dari uji antibakteri fraksi-fraksi dapat dilihat pada Tabel 4.5.

Berdasarkan Tabel 4.5 fraksi yang mempunyai daya hambat ditunjukkan pada fraksi 6, 7, 9, 10, 12, 13, 14, 15, dan 16. Hasil pengujian yang telah dilakukan terlihat bahwa masing-masing fraksi memiliki aktivitas antibakteri yang berbeda-beda terhadap bakteri *S. mutans* dilihat dari diameter zona hambat masing-masing fraksi.

Tabel 4.5. Diameter zona hambat fraksi-fraksi hasil pemisahan ekstrak daun Belimbing wuluh terhadap bakteri *S. mutans*. Tanda (-) menunjukkan tidak terdapat zona hambat disekeliling *paper disc*.

No. Fraksi	Diameter Zona Hambat (mm)
3	-
4	-
5	-
6	6,25
7	7,33
8	-
9	6,73
10	6,33
11	-
12	5,70
13	6,57
14	7,07
15	6,57
16	6,25
17	-
18	-
19	-
20	-

Aktivitas antibakteri yang berbeda-beda dari masing-masing fraksi terhadap bakteri *S. mutans* dikarenakan bakteri dan senyawa antibakteri yang terkandung di dalam masing-masing fraksi memiliki sensitivitas yang berbeda-beda (Brooks, *et al.*, 2001). Gambar 4.2 menyajikan hasil uji fraksi-fraksi pemisahan ekstrak daun Belimbing wuluh.



Gambar 4.2. Hasil uji fraksi-fraksi pemisahan ekstrak

Diantara semua fraksi yang diujikan, fraksi 7 memiliki daya hambat bakteri paling baik diantara fraksi lainnya dan paling berpotensi sebagai antibakteri terhadap bakteri *S. mutans*. Hal ini dikarenakan pada fraksi 7 memiliki diameter zona hambat lebih besar diantara fraksi yang lainnya yaitu 7,33 mm. Kemudian dari fraksi yang paling potensial tersebut dilakukan uji antibakteri kembali dengan konsentrasi lebih kecil.

Sehubungan dengan jumlah ekstrak yang didapatkan dari fraksi 7 sangat sedikit sehingga konsentrasi uji hanya dapat dicari pada konsentrasi 15–16 ppm. Hasil dari uji antibakteri fraksi 7 dapat dilihat pada Tabel 4.6.

Tabel 4.6. Diameter zona hambat fraksi 7 hasil pemisahan ekstrak daun Belimbing wuluh pelarut etil asetat terhadap bakteri *S. mutans*.

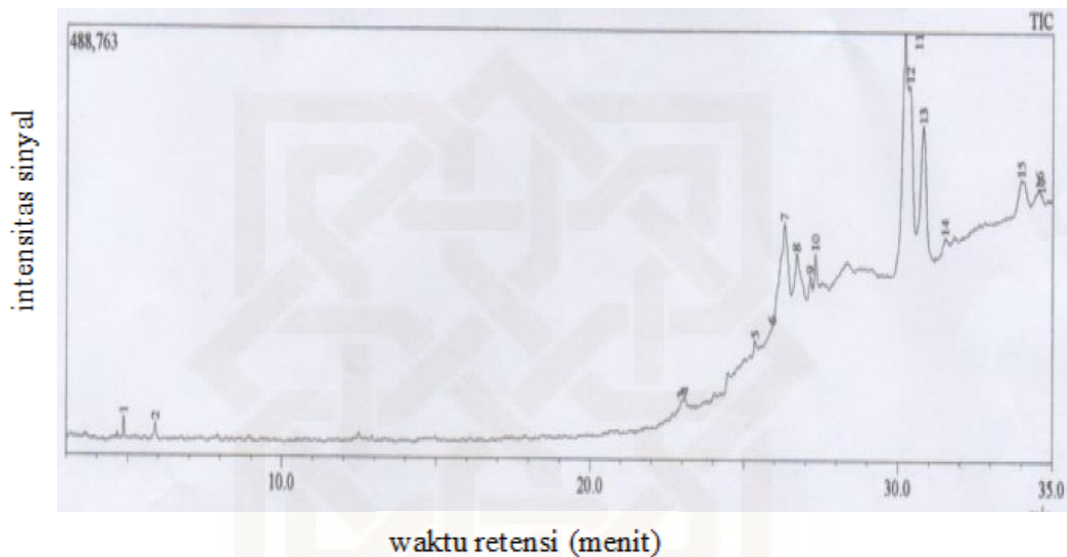
Konsentrasi (ppm)	Diameter Zona Hambat (mm)
15	7,45
16	6,29

Berdasarkan Tabel 4.6 terlihat bahwa konsentrasi 15 ppm dapat menghambat bakteri dengan baik dilihat pada zona bening yang terdapat disekeliling *papper disc* dengan panjang diameter zona bening yang diperoleh sebesar 7,45 mm dan merupakan konsentrasi terkecil yang diperoleh dari fraksi teraktif. Dari hasil yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa fraksi 7 memiliki konsentrasi lebih kecil dalam menghambat bakteri dibandingkan dengan ekstrak daun Belimbing wuluh pelarut etil asetat.

5. Identifikasi Senyawa Aktif Menggunakan GC-MS

Fraksi 7 hasil pemisahan ekstrak daun Belimbing wuluh pelarut etil asetat yang merupakan fraksi teraktif diidentifikasi menggunakan instrumen GC-MS. Instrumen GC-MS ini dipilih karena dapat mengetahui pemisahan suatu

komponen sekaligus analisis struktur berdasarkan bobot molekul dan pola fragmentasi (Wonorahardjo, 2013). Hasil yang diperoleh berupa kromatogram dan spektrum massa. Pada Gambar 4.3 merupakan kromatogram dari hasil pengujian menggunakan GC-MS.



Gambar 4.3 Kromatogram hasil pengujian menggunakan GC-MS

Hasil kromatogram yang diperoleh pada Gambar 4.3 terlihat bahwa puncak muncul tidak pada *baseline*-nya. Hal ini menunjukkan hasil pemisahan yang kurang baik. Secara teori, ketidaksempurnaan hasil pemisahan kemungkinan dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu kemurnian gas pembawa, kolom, suhu baik suhu injektor, kolom ataupun suhu detektor (Agusta, 2000). Menurut Muchtaridi (2007), adanya komponen-komponen pengganggu atau pengotor ketika analisis juga dapat menyebabkan ketidaksempurnaan hasil GC-MS. Mengurangi komponen pengganggu atau pengotor dapat memperbaiki puncak yang muncul pada kromatogram.

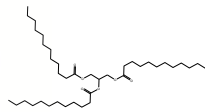
Penggunaan gas pembawa yang kemurniannya rendah mengakibatkan munculnya puncak yang bukan berasal dari sampel yang dianalisis (*ghost peak*) dan *baseline* kromatogram tidak rata (Agusta, 2000). Pada penelitian ini gas pembawa (Helium) memiliki kemurniaan yang tinggi. Selanjutnya, suhu pada tempat injeksi harus cukup tinggi untuk menguapkan sampel tetapi tidak terlalu tinggi, apabila terlalu tinggi molekul-molekul dalam sampel akan terurai. Selain itu, suhu pada kolom harus cukup tinggi sehingga analisis dapat diselesaikan dalam waktu yang layak dan cukup pendek. Suhu-suhu yang rendah memberikan pemisahan lebih baik, tetapi waktu retensi lebih panjang (Gritter, 1991).

Berdasarkan Gambar 4.3 terdapat 17 puncak kromatogram yang diperoleh dengan 4 puncak memiliki kelimpahan terbanyak. Pertama, Puncak kromatogram ke-11 terlihat paling banyak kelimpahannya dibandingkan dengan puncak kromatogram yang lain. Puncak kromatogram ke-11 memiliki prosentase senyawa sebesar 27,21% dengan waktu retensi 30,21 menit. Kemudian yang kedua puncak kromatogram ke-7 dengan prosentase senyawa sebesar 17,48% dengan waktu retensi 26,32 menit. Ketiga yaitu puncak kromatogram ke-13 dengan prosentase senyawa sebesar 16,94% dengan waktu retensi 30,81 menit.

Puncak keempat merupakan puncak kromatogram ke-12 dengan prosentase senyawa sebesar 15,28% dengan waktu retensi 30,37 menit. Selanjutnya, dari hasil puncak yang diperoleh dibandingkan dengan *library*. Setelah dibandingkan, puncak kromatogram ke-12 tidak direkomendasikan. Hal ini dikarenakan puncak kromatogram ke-12 memiliki *similarity index* yang sangat

kecil yaitu 75%. *Similarity index* yang diakui oleh Howe and Wiliam (1981) memiliki rentang $\geq 80\%$. Tabel 4.7 menyajikan hasil analisis spektra massa fraksi berdasarkan *library* (Wiley7Nist05.L).

Tabel 4.7. Hasil analisis spektra massa fraksi paling potensial hasil pemisahan ekstrak daun Belimbing wuluh pelarut etil asetat berdasarkan *library* (Wiley7Nist05.L).

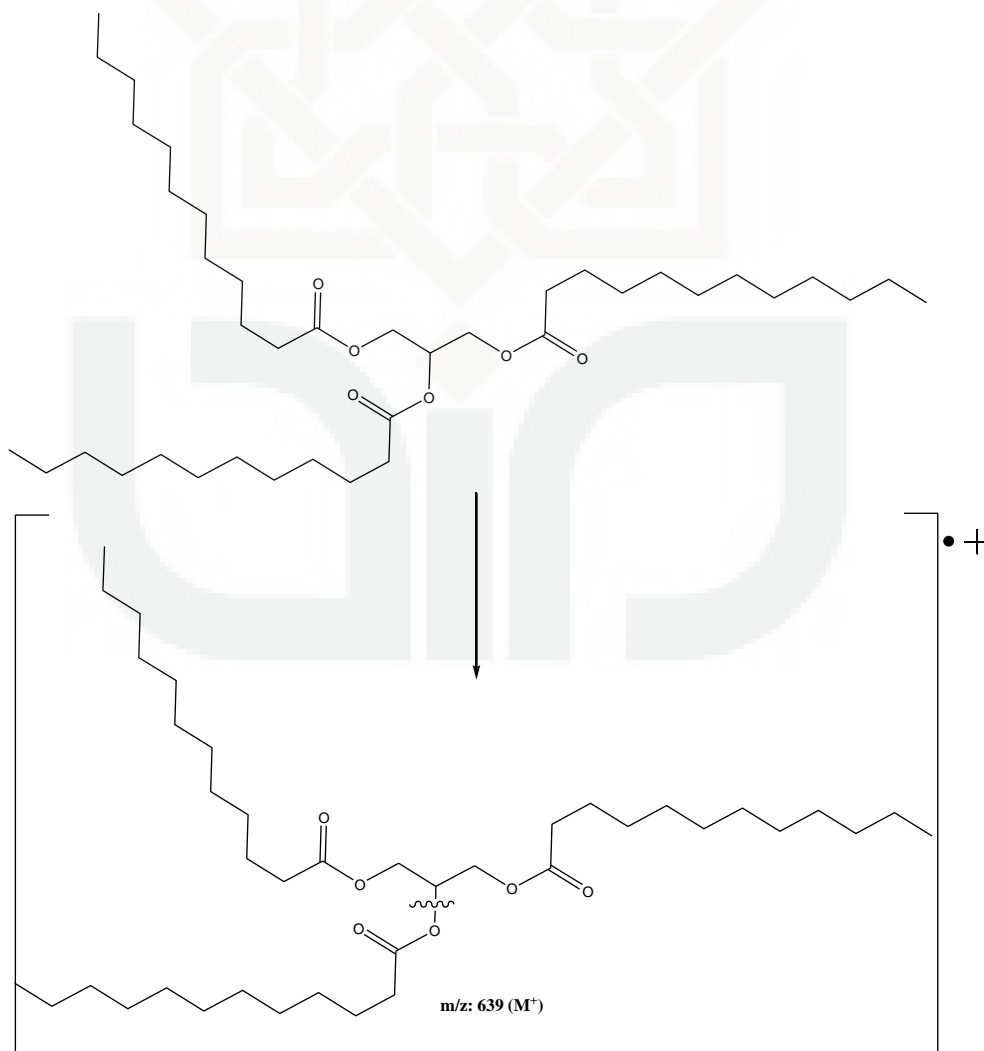
Puncak Ke-	Waktu Retensi (Menit)	Prosentase Senyawa (%)	Perkiraan Senyawa	Similarity Index (%)	Perkiraan Struktur
7	26,32	17,48	#unknown	83	#unknown
11	30,21	27,21	dodecanoic acid, 1,2,3 prapanetriyl ester	88	
13	30,81	16,94	#unknown	81	#unknown

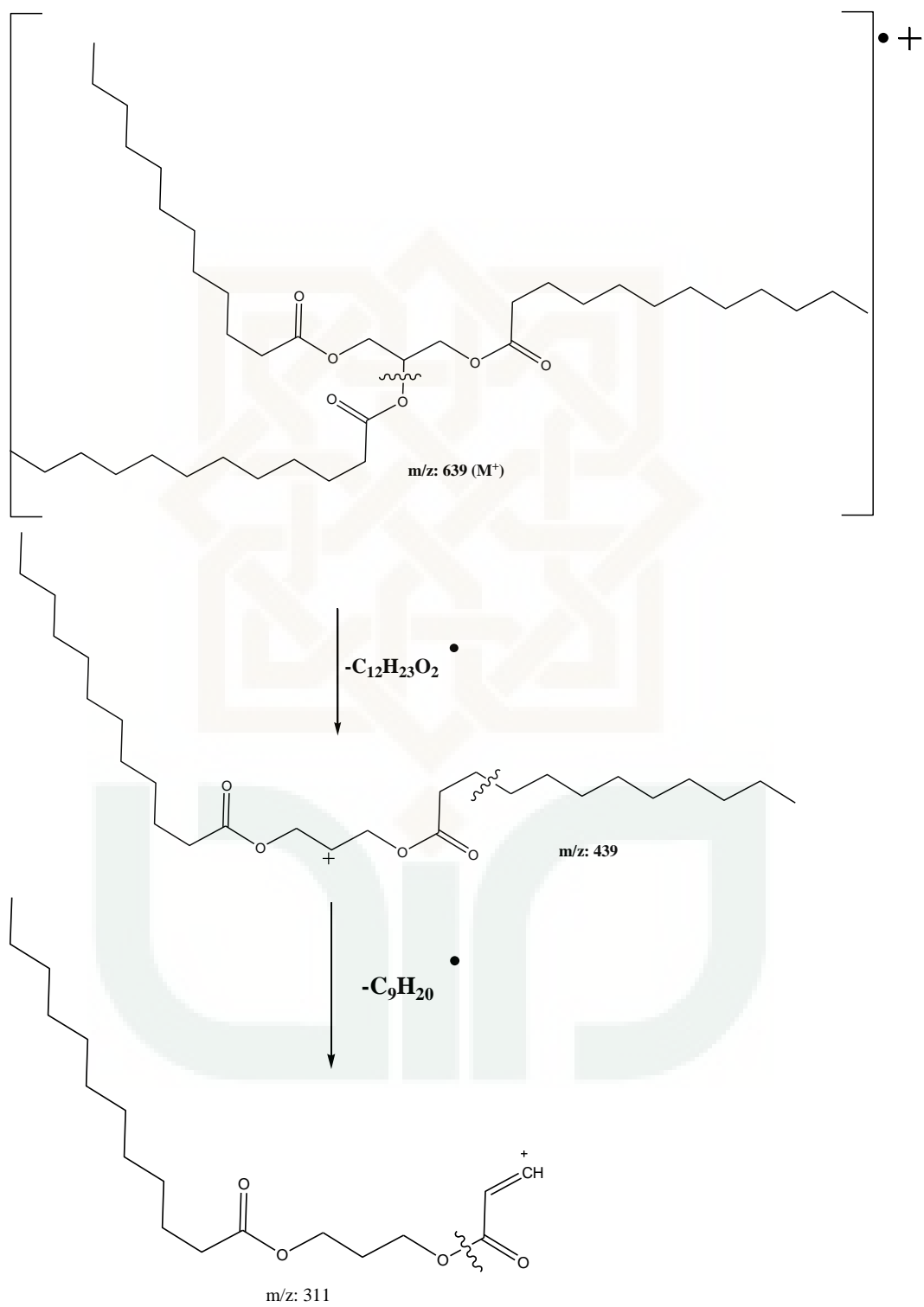
Berdasarkan hasil spektra yang diperoleh pada Tabel 4.8 diduga untuk puncak ke-7 dan 13 merupakan senyawa yang belum diketahui (*unknown*) sedangkan pada puncak ke-11 diduga merupakan senyawa asam lemak *dodecanoic acid, 1,2,3 prapanetriyl ester* dengan prosentase senyawa dalam sampel sebesar 27,21% .

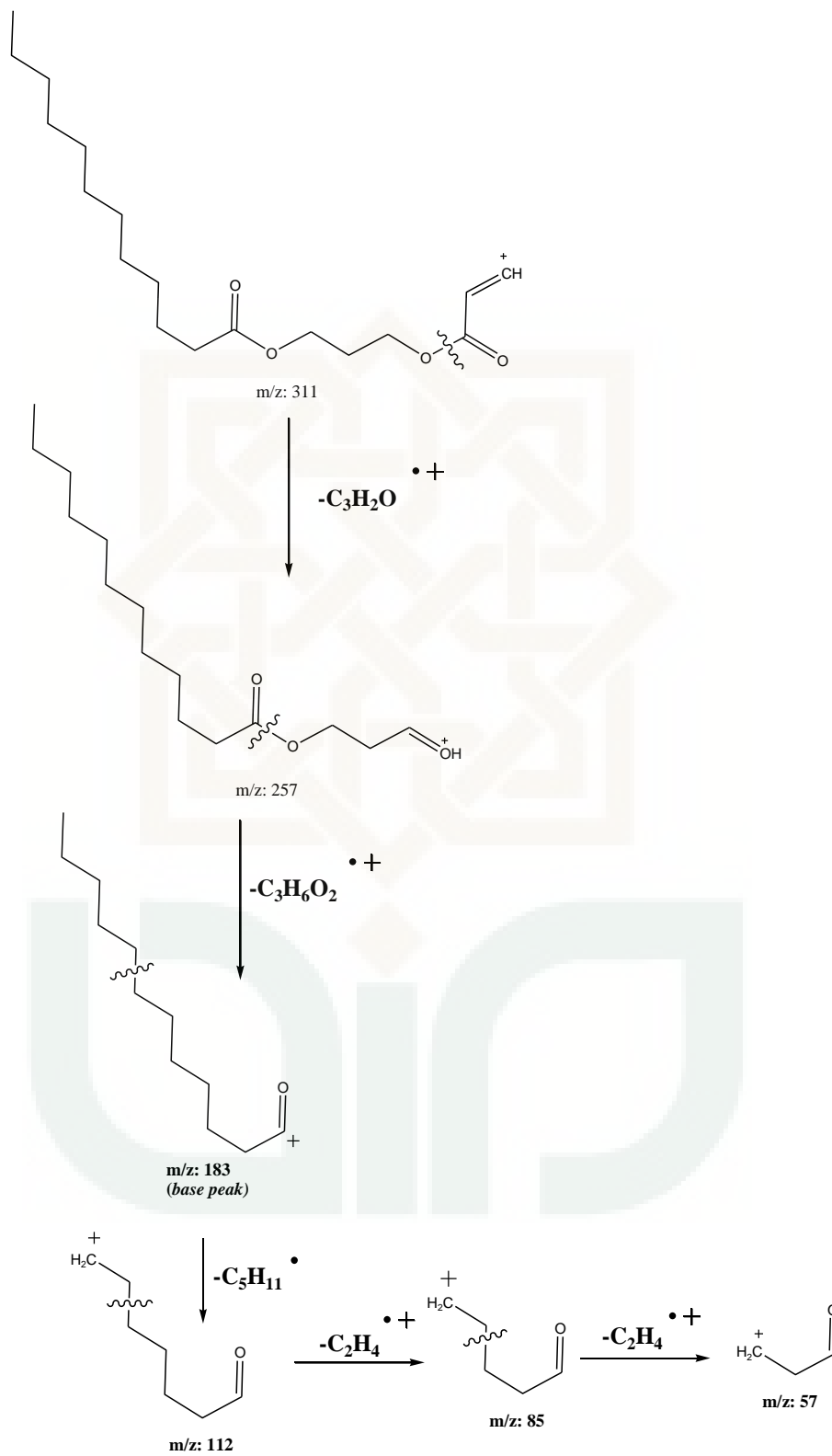
Senyawa pada puncak ke-7 dan 13 (Gambar 4.3) dengan waktu retensi masing-masing 26,32 menit dan 30,81 menit memiliki hasil spektra massa dengan tingkat kemiripan dengan *library* yang sangat kecil walaupun keduanya memenuhi kriteria yang diakui oleh Howe and Wiliam (1981). Hal ini dapat dilihat dari *peak* yang muncul pada spektra massa untuk puncak ke-7 dan 13 banyak yang berbeda dengan *library* (Lampiran 4), sehingga belum dapat dipastikan senyawa dalam kedua puncak tersebut sama dengan senyawa yang terdapat pada *library*. *Library* setiap GC mempunyai keterbatasan dan tidak

semua senyawa ada dalam *library*, sehingga perlu dilakukan analisis lebih lanjut menggunakan instrumen lain seperti FTIR (mengetahui gugus fungsi suatu senyawa) dan NMR (mengetahui jumlah proton dan jumlah lingkungan kimia) apabila ingin mengetahui struktur dari senyawa yang belum diketahui tersebut.

Selanjutnya, senyawa puncak ke-11 pada waktu retensi 30,21 menit memiliki kemiripan yang tinggi setelah dibandingkan dengan senyawa pada *library*. *Similarity index* yang dimiliki oleh puncak ke-11 yaitu sebesar 88% dengan senyawanya adalah *dodecanoic acid, 1,2,3 propanetriyl ester*. Pada Gambar 4.4 menunjukkan pola fragmentasi dari senyawa pada puncak ke-11.







Gambar 4.4. Pola fragmentasi puncak ke-11

Hasil spektra massa menunjukkan berat molekul dari senyawa tersebut adalah 639 g mol^{-1} . Pada M^+ ($mz^{-1} 639$) terjadi pelepasan ($-C_{12}H_{23}O_2^*$) menjadi ($mz^{-1} 439$) kemudian melepaskan ikatan ($-C_9H_{20}^*$) menjadi ($mz^{-1} 311$). Selanjutnya terjadi pelepasan kembali ikatan ($-C_3H_{20}^{*+}$) menjadi ($mz^{-1} 257$). Lebih lanjut, dilepaskan hingga menjadi ($mz^{-1} 85$). Ikatan ($-C_2H_4^{*+}$) kembali dilepaskan menjadi ($mz^{-1} 57$).

Penelitian yang dilakukan oleh Kumalasari, *et al.* (2014) menyebutkan bahwa senyawa *dodecanoic acid* merupakan hasil hidrolisis mikroalga *chlorella sp.* memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *S. aureus*. Menurut Murhadi (2009) asam lemak seperti miristoleat, palmitoleat, linolenat, kaprat, laurat (*dodecanoic acid*), dan miristat terbukti memiliki aktivitas bakteri terhadap bakteri *S. aureus*.

Murhadi (2009) menyebutkan bahwa asam lemak berpotensi sebagai antibakteri dikarenakan asam lemak merupakan asam organik yang tidak terdisosiasi masuk ke dalam membran sel bakteri dan menyebabkan keseimbangan asam basa dan produksi energi dalam sel bakteri jadi terganggu.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, diketahui fraksi 7 (15 ppm) memiliki konsentrasi menghambat lebih baik daripada ekstrak etil asetat (17 ppm). Fraksi 7 lebih berpotensi sebagai senyawa antibakteri sehingga dilakukan identifikasi senyawa aktif menggunakan GC-MS. Hasil identifikasi fraksi 7 menggunakan GC-MS menunjukkan bahwa kandungan dari fraksi tersebut adalah *dodecanoic acid*, *1,2,3 propanetriyl ester* yang merupakan senyawa aktif dari golongan asam lemak.