

**LAPORAN HASIL PENELITIAN UNGGULAN
PERGURUAN TINGGI
Tahun Anggaran 2012**



**FRAKSINASI DAN UJI DAYA HAMBAT BAKTERI
Mycobacterium tuberculosis DARI EKSTRAK *n*-HEKSANA
DAN METANOL UMBI BIDARA UPAS
(*Merremia mammosa* Hall.)**

Prof. Dr. Mangestuti Agil, Apt., MS
Rr. Retno Widyowati, S.Si, Apt., M.Pharm
Prof. Dr. Noor Erma Sugijanto, MS, Apt

**Dibiayai oleh DIPA Universitas Airlangga sesuai dengan Surat Keputusan Rektor
Tentang Kegiatan Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi Tahun Anggaran 2012
Nomor: 2613/H3/KR/2012, Tanggal 9 Maret 2012**

UNIVERSITAS AIRLANGGA

**LAPORAN HASIL PENELITIAN UNGGULAN
PERGURUAN TINGGI
Tahun Anggaran 2012**



**FRAKSINASI DAN UJI DAYA HAMBAT BAKTERI
Mycobacterium tuberculosis DARI EKSTRAK *n*-HEKSANA
DAN METANOL UMBI BIDARA UPAS
(*Merremia mammosa* Hall.)**

Prof. Dr. Mangestuti Agil, Apt., MS
Rr. Retno Widyowati, S.Si, Apt., M.Pharm
Prof. Dr. Noor Erma Sugijanto, MS, Apt

**Dibiayai oleh DIPA Universitas Airlangga sesuai dengan Surat Keputusan Rektor
Tentang Kegiatan Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi Tahun Anggaran 2012
Nomor: 2613/H3/KR/2012, Tanggal 9 Maret 2012**

UNIVERSITAS AIRLANGGA

HALAMAN PENGESAHAN

1. JUDUL : Fraksinasi dan Uji Daya Hambat Bakteri *Mycobacterium tuberculosis* dari Ekstrak *n*-Heksana dan Metanol Umbi Bidara Upas (*Merremia mammosa* Hall.)
2. Ketua Peneliti
- a. Nama Lengkap : Prof. Dr. Hj. Mangestuti Agil, MS, Apt.
 b. Jenis Kelamin : P
 c. NIP : 19500422 198002 2001
 d. Pangkat/golongan : /Gol. IV//a
 e. Jabatan Fungsional : Pembina
 f. Bidang Keahlian : Farmakognosi/fitokimia
 g. Fakultas/Jurusan : Farmasi/Departemen Farmakognosi dan Fitokimia Universitas Airlangga
 h. Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Tim Peneliti

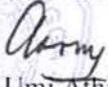
No	Nama Peneliti	BIDANG KEAHLIAN	FAKULTAS/ JURUSAN	PERGURUAN TINGGI
1.	Prof. Dr. Mangestuti Agil, MS., Apt.	Farmakognosi/Fitokimia	Farmasi	Universitas Airlangga
2.	Rr. Retno Widyowati, S.Si, Apt., M.Pharm	Farmakognosi/Fitokimia	Farmasi	Universitas Airlangga
3.	Prof. Dr. Noor Erma Sugijanto, MS, Apt	Kimia analisa dan Mikrobiologi	Farmasi	Universitas Airlangga

3. Pendanaan dan Jangka Waktu Penelitian : 2 tahun
- a. Jangka waktu penelitian yang diusulkan: 2 tahun
 b. Biaya yang diusulkan : Rp. 85.000.000,-
 c. Biaya yang disetujui tahun ini : Rp. 35.000.000,-

Surabaya, 31 Oktober 2012

Mengetahui,
 Dekan Fakultas Farmasi
 Universitas Airlangga,

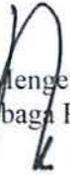
Ketua Peneliti,


 Dr. Hj. Umi Athijah, Apt., MS
 NIP.19560407 198103 2.001


 Prof. Dr. Hj. Mangestuti Agil, MS, Apt
 NIP. 19500422 198002 2001



Mengetahui :
 Ketua Lembaga Penelitian Unair,


 Dr. Doko Agus Purwanto, Apt., MSi
 NIP 19590805 198701 1

RINGKASAN

Indonesia adalah salah satu negara dengan prevalensi penyakit Tuberculosis (TBC) yang tinggi. Menurut WHO, Indonesia menjadi negara penyumbang penyakit TBC terbesar ketiga di Asia setelah India dan China dengan angka kematian yang cukup tinggi tiap tahunnya. Penyakit yang biasa menyerang paru-paru ini disebabkan oleh penularan langsung bakteri *Mycobacterium tuberculosis*.

Sanitasi yang buruk, kurangnya kesadaran akan kebersihan ditambah kurang berhasilnya Obat Anti Tuberculosis (OAT) yang ada sekarang menjadi penyebab sulitnya pemberantasan penyakit ini di Indonesia. Adanya resistensi dan efek samping yang sangat mengganggu dari OAT menjadi penyebab diperlukannya suatu penemuan atas obat antimikroba baru terutama dari bahan alam yang aman, efektif dan memiliki efek samping yang rendah.

Umbi Bidara Upas (*Merremia mammosa* Hall.) telah digunakan masyarakat Madura secara turun temurun dari generasi ke generasi sebagai obat anti tuberkulosis. Pemakaian tersebut belum memiliki bukti ilmiah mengenai efektifitas dan keamanannya. Pada penelitian terdahulu, Mangestuti dkk (2010) membuktikan khasiat ekstrak air, *n*-heksana dan metanol dalam menghambat pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis*. Oleh sebab itu, dalam penelitian ini dilakukan pemisahan lebih lanjut terhadap ekstrak *n*-heksana dan metanol, dan terhadap fraksi yang mengandung senyawa yang terdeteksi melalui skrining fitokimia akan dilakukan uji aktifitas daya hambat terhadap bakteri yang sensitif TBC (*Mycobacterium tuberculosis*) dengan menggunakan metode Dilusi Agar untuk mencari Konsentrasi Hambat Minimum (KHM). Selanjutnya fraksi yang memiliki daya hambat paling optimal akan disolasi lebih lanjut guna mendapatkan kandungan senyawa yang poten sebagai anti-TBC.

Hasil penelitian terhadap fraksi ekstrak *n*-heksana menunjukkan terdapatnya sebuah fraksi yang dinamakan fraksi E. Fraksi E menunjukkan aktivitas antituberkulosis dengan konsentrasi 400-12,5 µg/ml. Sampai pada akhir penelitian belum dapat ditetapkan konsentrasi hambat minimum.

Hasil penelitian terhadap fraksi ekstrak metanol menunjukkan terdapatnya fraksi yang disebut fraksi 4 dengan MIC 50 µg/ml.

Keywords: Bidara Upas, bakteri sensitif TBC (*Mycobacterium Tuberculosis*), KHM, fraksinasi

Abstract**ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF FRACTIONS OF EXTRACT OF n. HEXANE
AND METHANOL OF BIDARA UPAS (*Merremia mammosa* (Lour.) Hallier f.)'s
AGAINST*****Mycobacterium tuberculosis***

Bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.) Hallier f.) is known as traditional anti-Tuberculosis plant in Madura. This study was aimed to investigate antibacterial activity of fractions of n. hexane and methanol of Bidara upas inhibiting *Mycobacterium Tuberculosis* growth. These fractions were made by using vacuum liquid chromatography methods with n. hexane and a mixture of chloroform and methanol as the eluent. A former research showed n.hexane and methanol extracts contained flavonoid and terpenoid components. The antibacterial test for n. hexane, fraction E showed antibacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis* H37RV ATCC 27294 at the concentration of 400-12,5 µg/ml. Its MIC has not been detected yet.

In antibacterial test for methanol extract, 9 fractions at 500 µg/ml concentration was chosen to be analyzed the antibacterial activity. The result showed only one fraction, known as fraction 4, showed antibacterial activity against both *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv 27294 strains. The MIC of fraction 4 is 50 µg/ml.

Keyword : antibacterial, flavonoid, terpen, *Merremia mammosa*, tuberculosis

PRAKATA

Puji syukur kami sampaikan atas kesempatan yang telah kami terima untuk melaksanakan Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi Tahun Anggaran 2012 yang berjudul:

**FRAKSINASI DAN UJI DAYA HAMBAT BAKTERI *Mycobacterium tuberculosis*
DARI EKSTRAK *n*-HEKSANA DAN METANOL UMBI BIDARA UPAS
(*Merremia mammosa* Hall.)**

Melalui program tersebut, kami mendapatkan dana untuk melanjutkan penelitian yang sudah dilakukan terhadap umbi bidara upas yang memang secara turun temurun sudah digunakan oleh masyarakat Madura sebagai obat tuberkulosis.

Melalui informasi pemakaian sari umbi tersebut secara empiris, maka diharapkan akan diperoleh landasan ilmiah secara lebih dalam yang berkaitan dengan senyawa aktif dan dosis. Dengan demikian, diharapkan akan diperoleh alternatif cara pengobatan penyakit tuberkulosis yang sampai sekarang belum dapat diberantas secara tuntas.

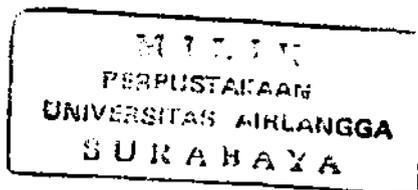
Bersama ini, kami menyampaikan terima kasih kepada Rektor Universitas Airlangga, Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat Universitas Airlangga, Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga atas kesempatan yang sudah kami peroleh tersebut.

Kami berharap agar hasil program ini membawa manfaat bagi upaya pemanfaatan bahan alam untuk tujuan kesehatan.

Ketua tim

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN.....	i
RINGKASAN DAN SUMMARY.....	ii
ABSTRAK	iii
PRAKATA	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	3
BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN.....	15
BAB IV. METODE PENELITIAN	16
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	22
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN	45
DAFTAR PUSTAKA	46



DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel II.1 Penggolongan terpenoid	6
Tabel V.1. h. Hasil KLT skrining fitokimia terpenoid ekstrak <i>n</i> -heksana umbi <i>M. mammosa</i> (Lour.)	23
Tabel V.2. h. Hasil KLT skrining fitokimia triterpenoid ekstrak <i>n</i> -heksana umbi.....	24
Tabel V.3. h. Hasil KLT penggabungan fraksi dari fraksi hasil pemisahan ekstrak <i>n</i> -heksana dengan Kromatografi Cair Vakum.....	26
Tabel V.4.h. Hasil Uji Aktivitas Antimikroba Fraksi <i>n</i> -Heksana.....	27
Tabel V.5.h. Hasil Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) Fraksi <i>n</i> -Heksana.....	28
Tabel V.1.m. Hasil KLT skrining ekstrak metanol umbi bidara upas.....	32
Tabel V.2.m. Hasil KLT fraksi ekstrak metanol umbi bidara upas dengan eluen kloroform:metanol.....	34
Tabel V.3.m. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Ekstrak Metanol.....	35
Tabel V.4.m. Hasil Penentuan Konsentrasi Hambat Minimal (KHM).....	37

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1. Tanaman <i>Merremia mammosa</i> Hall.....	3
Gambar 2.2 Struktur merremosida a, b, c, d, e, f, g, h ₁ dan h ₂	4
Gambar 2.3 Struktur mammosida A, B, H ₁ dan H ₂	5
Gambar 2.4 Struktur kimia terpenoid	5
Gambar 5.1. h. Kromatogram Lapis Tipis ekstrak <i>n</i> -heksana umbi <i>Merremia mammosa</i>	23
Gambar 5.2. h. Kromatogram Lapis Tipis ekstrak <i>n</i> -heksana umbi <i>M.mammosa</i> (Lour.)	24
Gambar 5.3. h. Uji Salkowski ekstrak <i>n</i> -heksana.....	24
Gambar 5.4.h. Kromatogram Lapis Tipis 44 fraksi hasil pemisahan ekstrak <i>n</i> -heksana dengan Kromatografi Cair Vaku	25
Gambar 5.5.h. Kromatogram Lapis Tipis 6 fraksi hasil penggabungan fraksi	25
Gambar 5.6.h. Hasil Uji Aktivitas Antimikroba Fraksi <i>n</i> -Heksana.....	27
Gambar 5.7.h. Hasil Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) Fraksi <i>n</i>	29
Gambar 5.8.h. Hasil positif mikroskopis terhadap media pertumbuhan <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	30
Gambar 5.9.h. Hasil negative mikroskopis terhadap media pertumbuhan <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	30
Gambar 5.1.m. Skema Hasil Pembuatan Ekstrak Umbi bidara upas (<i>Merremia mammosa</i> Hall)	31
Gambar 5.2.m. Kromatogram hasil KLT ekstrak metanol umbi bidara upas (<i>Merremia mammosa</i> (Lour.) Hallier f.).....	32
Gambar 5.3.m. Hasil KLT 12 fraksi hasil kromatografi cair vakum.....	33
Gambar 5.4.m. Hasil Uji Aktivitas Antimikroba Fraksi metanol.....	36
Gambar 5.5.m. Hasil penentuan KHM pada Fraksi 4 dengan konsentrasi (a) 25 µg/ml dan (b) 12,5 µg/ml	37
Gambar 5.6.m. Hasil mikroskopis terhadap media pertumbuhan <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv ATCC 27294 BTA negatif	38
Gambar 5.7.m. Hasil mikroskopis terhadap media pertumbuhan <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv ATCC 27294 BTA positif	39

BAB I. PENDAHULUAN



1.1. Latar Belakang

Tuberkulosis (TB) adalah penyakit menular langsung yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis* yang menyerang paru dan organ tubuh lainnya. *Mycobacterium tuberculosis* bersifat khusus, yaitu tahan terhadap asam pada pewarnaan sehingga disebut Basil Tahan Asam (BTA), cepat mati dengan sinar matahari langsung, tetapi dapat bertahan hidup beberapa jam di tempat yang gelap dan lembab. Di dalam jaringan tubuh kuman ini dapat bersifat tidak aktif (*dormant*) (Anonim, 2002). Menurut WHO terdapat 22 negara yang berprevalensi penderita Tuberkulosis yang tinggi, 10 negara berada di Asia dengan prevalensi yang tertinggi ialah India, Cina dan Indonesia.

Hampir seluruh daerah di Indonesia mengalami permasalahan tuberkulosis. Tingkat prevalensi tuberkulosis di DIY-Bali adalah 64/100.000 orang, di Jawa 107/100.000 orang, di Sumatera 160/100.000 orang, dan wilayah KTI mempunyai tingkat prevalensi yang lebih tinggi dengan 210/100.000 orang. Laporan tuberkulosis WHO yang terbaru (2006) menyatakan, bahwa pada tahun 1999, Indonesia masih merupakan negara penyumbang Tuberkulosis terbesar ke 3 di dunia setelah India dan Cina. Dalam laporan itu disebutkan pula, bahwa jumlah kasus baru adalah sekitar 539.000 dengan jumlah kematian 101.000 pertahun (Anonim, 2004).

Peningkatan kasus tuberkulosis ini disebabkan tingginya angka resistensi terhadap obat tuberkulosis, baik resistensi primer maupun resistensi sekunder. Penyebab resistensi itu antara lain karena pemakaian obat antituberkulosis (OAT) tunggal, kombinasi OAT yang tidak memadai dan pemakaian OAT yang tidak teratur (Mansyur, 2001). Penderita tuberkulosis harus menjalani pengobatan ulang disebabkan beberapa faktor yaitu lalai atau berhenti sebelum akhir pengobatan, kambuh dan gagal dalam pengobatan. Laporan *Anti-Tuberculosis Drug Resistance in the World*, didasarkan pada informasi yang dikumpulkan antara tahun 2002-2006 pada 90.000 pasien TB di 81 negara.

Penanggulangan TB-paru pada penderita dengan kuman TB sensitif memerlukan waktu pengobatan 6 bulan, sementara untuk penderita TB yang resistensi (MDR-TB) harus menggunakan OAT lini kedua yang sangat mahal. Disamping angka kesembuhannya yang tidak menjamin dan efek samping yang sangat toksis, diperlukan waktu penyembuhan yang sangat lama (Zulkarnain, 2004).

Salah satu cara pengobatan tuberkulosis yang sudah dilaksanakan secara turun temurun di Indonesia adalah dengan konsumsi umbi bidara upas. Bidara upas adalah tanaman yang mempunyai nama ilmiah *Merremia mammosa* Hall (Convolvulaceae). Tanaman ini tumbuh baik di daerah Sumenep, Madura dan rebusan umbi dalam air digunakan oleh penduduk untuk mengobati penyakit tuberkulosis (Hembing, 2004).

Beberapa literatur memang menyebutkan pemakaian umbi tanaman ini sebagai obat tradisional (Anonim, 1980), namun dukungan ilmiah pada pemakaiannya untuk pengobatan tuberkulosis belum pernah dilakukan. Penelitian yang sudah dilakukan terhadap ekstrak air, *n*-heksana dan metanol untuk mengetahui daya hambat terhadap

bakteri *Mycobacterium tuberculosis* membuktikan aktivitas ekstrak dalam menghambat bakteri tersebut (Mangestuti, 2010). Oleh sebab itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui daya hambat fraksi ekstrak terhadap bakteri itu. Fraksi ekstrak *n*-heksana dan metanol yang dipilih adalah yang mengandung senyawa yang diduga bekerja sebagai anti kuman tuberkulosis yang diketahui melalui identifikasi senyawa secara kimiawi. Penelitian terdahulu membuktikan, bahwa pada ekstrak *n*-heksana umbi *M. mammosa* Hall terkandung senyawa golongan triterpenoid (Kriselina, 1997). Penelitian terhadap fraksi ekstrak tersebut merupakan langkah lanjutan menuju pada penelitian senyawa aktif yang terkandung di dalam ekstrak.

Pendekatan untuk mengetahui aktivitas biologis fraksi ekstrak dilakukan dengan uji daya antibakteri terhadap bakteri yang sensitif TBC (*Mycobacterium tuberculosis*) secara *in vitro* menggunakan metode dilusi agar. Uji aktivitas antimikroba digunakan pula untuk mengetahui konsentrasi hambat minimum (KHM). Fraksi yang menunjukkan KHM terendah akan diteliti lebih lanjut untuk mengetahui senyawa aktif yang terkandung di dalamnya.

1.2. Tujuan Khusus

Penelitian ini diharapkan dapat mendasari penggunaan umbi bidara upas secara ilmiah sebagai obat dan selanjutnya akan diperoleh suatu obat anti tuberkulosis baru yang berasal dari bahan alam yang efektif dan aman.

1.3. Urgensi (Keutamaan) Penelitian

Data WHO yang menyebutkan bahwa saat ini Indonesia adalah negara dengan prevalensi TBC yang tinggi (no.3 di Asia dibawah China dan India) memerlukan upaya yang serius untuk menanggulangnya Pengobatan TBC dengan obat anti tuberkulosis yang ada saat ini, seperti Streptomisin, Ethambutol dan Isoniazid sudah menimbulkan efek samping dan resistensi yang dialami sejumlah pasien.

Masyarakat Madura telah menggunakan umbi bidara upas (*Merremia mammosa* Hall) secara turun temurun sebagai obat anti TBC. Namun, belum terdapat penelitian ilmiah yang membuktikan khasiat dan keamanan penggunaannya. Penelitian awal telah dilakukan pada tahun 2010 (Mangestuti, 2010) untuk mempelajari daya hambat ekstrak air, *n*-heksana dan metanol umbi bidara upas terhadap bakteri yang sensitif TBC (*Mycobacterium tuberculosis*). Hasilnya menunjukkan hambatan ekstrak tersebut dengan konsentrasi hambat minimum ekstrak air 300 µg/ml, ekstrak *n*-heksana 300 µg/ml dan ekstrak metanol 400 µg/ml. Penelitian tersebut perlu dilanjutkan dengan penelitian hambatan fraksi dari ekstrak *n*-heksana dan metanol yang mengandung zat tertentu terhadap bakteri yang sensitif TBC (*Mycobacterium tuberculosis*). Kandungan golongan senyawa fraksi diketahui melalui skrining fitokimia. Penelitian ini diharapkan dapat menunjukkan secara lebih spesifik fraksi dari ekstrak *n*-heksana dan metanol yang mempunyai aktifitas hambatan terhadap bakteri yang sensitif TBC (*Mycobacterium tuberculosis*). Hal ini akan menambah informasi terhadap penelitian kandungan senyawa aktif umbi bidara upas yang bekerja sebagai anti tuberkulosis. Selain itu diharapkan penelitian ini juga dapat mensukseskan program pemerintah Indonesia Sehat 2010 dan sekaligus usaha dalam memberantas penyakit TBC di Indonesia.

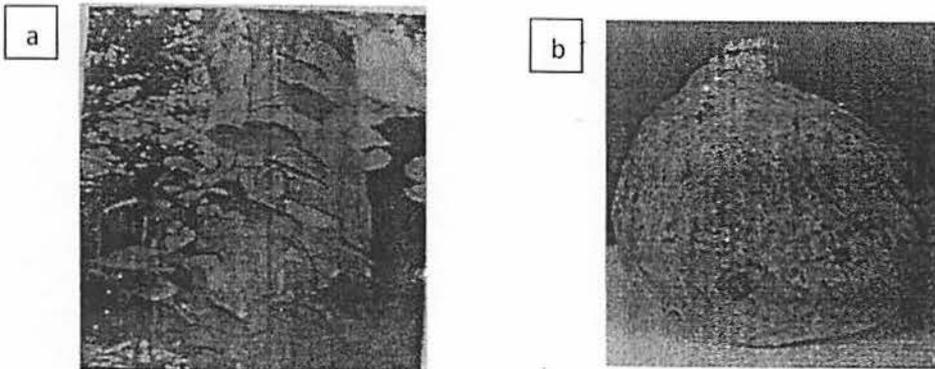
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan tentang *Merremia mammosa* Hall.

2.1.1 Klasifikasi Tanaman

Klasifikasi secara terperinci dari tumbuhan pada penelitian ini adalah sebagai berikut (Backer and Bakhuizen, 1965; Heyne, 1987; Tjitrosoepomo, 1991):

Divisi	: Spermatophyta
Subdivisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Sub kelas	: Metachlamydae (Sympetalae)
Bangsa	: Tubiflorae
Suku	: Convolvulaceae
Marga	: <i>Merremia</i>
Jenis	: <i>Merremia mammosa</i> Hall.
Nama daerah	:
Sumatra	: Bidara upas
Jawa	: Blanar, widara upas
Ambon	: Hailale
Indonesia	: Bidara upas
Sinonim	: <i>Ipomoea mammosa</i> , Chois. <i>Battata mammosa</i> , Rumph. <i>Convolvulus mammosus</i> , Hall.



Gambar 2.1 (a) Tanaman *Merremia mammosa* Hall.

(b) Umpi *Merremia mammosa* Hall (Ismiati, 1999)

2.1.2 Habitus dan Morfologi Tanaman

Habitus : tumbuhan memanjat

Batang : melilit dengan batang-batangnya bengkok runcing, bulat dan ramping. Panjang batang 3-6 m

Daun : tunggal, berseling, helai daun tidak berbentuk perisai, pangkal daun berbentuk jantung atau bundar, ujung daun runcing, panjang daun 5-12 cm, lebar 4-15 cm

- Bunga : berbentuk lonceng atau payung menggarpu, sampai 4 bunga, mahkota bunga berwarna putih, panjang 7-8 cm. Kelopak bunga 4 helai dan berbentuk bulat telur atau lonjong.
- Umbi : menyerupai kentang atau ubi jalar. Di tanah yang subur akan menjadi lebih besar dari umbi biasa, dapat besar mencapai buah kelapa
- Akar : banyak bergelantungan, letak akar yang paling atas setengah di atas tanah (Anonim, 1979; Heyne, 1987).

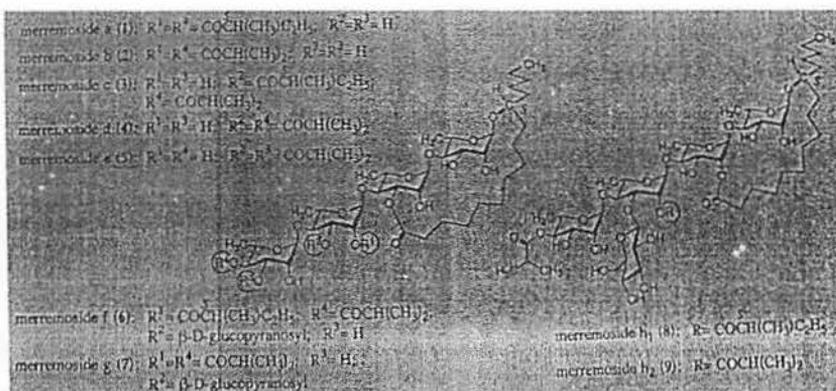
2.1.3 Penyebaran dan Tempat Tumbuh

M. mammosa Hall berasal dari Asia Tenggara, yang kemudian menyebar ke daerah India, Indo Cina dan Andaman. Di Malaysia bagian Timur, bidara upas telah dibudidayakan sejak berabad-abad yang lalu untuk dimakan umbinya. Kemudian tanaman ini menyebar ke Filipina, terus ke Ambon, Bali, Jawa. Baru pada awal abad ke 20 tanaman ini di Jawa, digunakan juga untuk obat dan ternyata mempunyai khasiat yang beragam (Sastrapradja *et al.*, 1977).

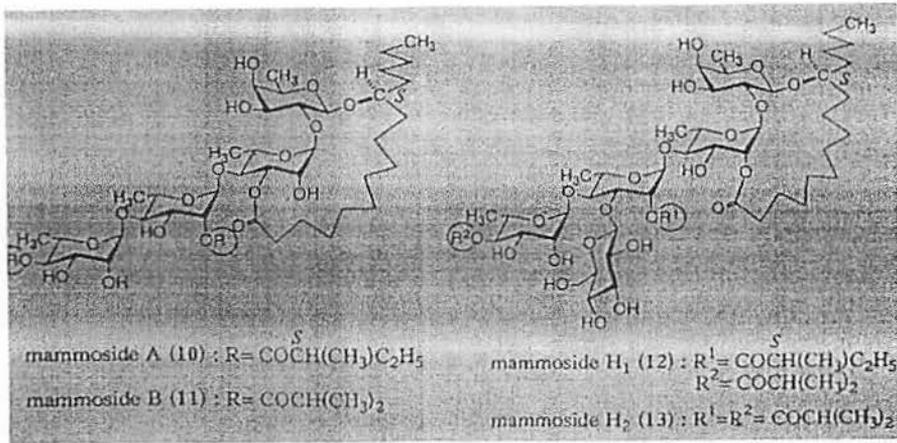
Jenis ini tumbuh di dataran rendah pada ketinggian sekitar 250 m dpl., pada tempat-tempat yang terlindung dan tanah yang lembab. Di kebun-kebun orang membiarkannya memanjat pohon-pohon dengan batang-batangnya bengkok bulat dan ramping. Di Jawa ditanam di pekarangan dan di Madura kadang-kadang ditemukan tumbuh liar (Anonim, 1979; Sastrapradja *et al.*, 1977).

2.1.4 Kandungan Tanaman

Kandungan senyawa yang terdapat dalam tanaman bidara upas adalah suatu resin glikosida, zat pahit, damar, amilum, tanin (Chairani *et al.*, 1984; Anonim, 1979). Berdasarkan penelitian Kriselina pada tahun 1997 disebutkan bahwa kandungan kimia dalam ekstrak *n*-heksana *M. mammosa* Hall adalah triterpenoid. Dari literatur lain, hasil penelitian Kitagawa *et al.* pada tahun 1997 melaporkan bahwa ada dua macam resin glikosida yaitu merremosida dan mammosida. Merremosida terdiri dari sembilan struktur yang berbeda yaitu struktur a, b, c, d, e, f, g, h₁, h₂. Sedangkan mammosida terdiri dari empat struktur yaitu A, B, H₁ dan H₂. Berikut ini adalah gambar merremosida dan mammosida:



Gambar 2.2 Struktur merremosida a, b, c, d, e, f, g, h₁ dan h₂ (Kitagawa, 1997)

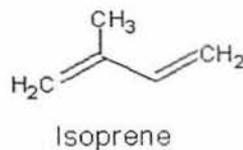
Gambar 2.3 Struktur mammosida A, B, H₁ dan H₂ (Kitagawa, 1997)

2.1.5 Kegunaan Tanaman

Bagian umbi *M. mammosa* Hall digunakan sebagai obat radang amandel, batuk rejan, bronkitis, tuberkulosis, batuk darah, disentri, perut sakit, demam, tipes, difteri, digigit ular, busung lapar, hidung bernanah, kudis, kencing manis (diabetes), kencing batu, kurang darah, eksema, luka kanker, radang usus (umbai usus buntu), lepra (Heyne, 1987; Mardiswojo, 1986; Widowati *et al.*, 1997). Selain digunakan sebagai sumber karbohidrat, orang Jawa menggunakan umbi bidara upas ini untuk berbagai macam obat. Parutan umbinya dapat digunakan untuk memperbanyak air susu ibu (Sastrapradja *et al.*, 1977). Dilaporkan juga bahwa tanaman ini digunakan untuk pengobatan diabetes serta penyakit tenggorokan dan sistem respirasi (Kitagawa *et al.*, 1997).

2.2 Tinjauan tentang Terpenoid

Terpenoid terdiri dari molekul-molekul isoprena, yaitu $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$, dan kerangka karbonnya dibangun dari gabungan dua atau lebih unit C₅ (Harborne, 1987). Adapun gambar struktur kimia terpenoid dapat dilihat pada gambar 2.4.

Gambar 2.4 Struktur kimia terpenoid (www.apsnet.org)

Terpenoid terdiri atas beberapa macam senyawa, mulai dari komponen minyak atsiri, yaitu monoterpen dan seskuiterpen yang mudah menguap (C₁₀ dan C₁₅), diterpen yang sukar menguap (C₂₀), sampai ke senyawa yang tidak menguap, yaitu triterpenoid dan sterol (C₃₀), serta pigmen karotenoid (C₄₀). Pada tabel II.1 dapat dilihat penggolongan terpenoid dan contoh tanaman yang mengandung terpenoid.

Tabel II.1 Penggolongan terpenoid (Harborne, 1987)

Jumlah unit isoprene	Jumlah atom karbon	Nama atau kelas	Contoh
1	C ₅	Isoprena	Daun <i>Hamamelis japonica</i>
2	C ₁₀	Monoterpenoid	Monoterpen, minyak essensial (contoh mentol dari mint)
3	C ₁₅	Seskuiterpenoid	Seskuiterpen pada minyak essensial, seskuiterpen lakton (Compositae)
4	C ₂₀	Diterpenoid	Asam diterpen pada resin tanaman
6	C ₃₀	Triterpenoid	Sterol (sitosterol), triterpen (amyrin), saponin (yamogenin), (glikosida jantung)
8	C ₄₀	Tetraterpenoid	Karotenoid (karotene)
N	C _n	Poliisoprena	Karet (<i>Hevea brasiliensis</i>)

Secara kimia, terpenoid adalah senyawa yang larut lemak, dan terlokasi di sitoplasma dari sel tumbuhan. Minyak yang essensial terkadang terdapat pada glandular sel pada permukaan daun, sementara karotenoid biasanya secara khusus bergabung dengan kloroplas pada daun dan dengan kromoplas pada petal (Harborne, 1987).

Terpenoid secara normal diekstraksi dari jaringan tumbuhan dengan petroleum, eter atau kloroform dan dapat dipisahkan dengan kromatografi dengan silika atau alumina dengan menggunakan solven yang sama. Dalam deteksinya dalam skala kecil sering mengalami kesulitan, kecuali karotenoid semuanya tidak berwarna dan tidak ada pereaksi kromogenik semesta yang peka. Berdasarkan hal tersebut pendeteksian masih bersifat nonspesifik pada pelat KLT dengan H₂SO₄ terkonsentrat dan pemanasan (Harborne, 1987).

Walaupun secara biosintesis terpenoid diperoleh dari molekul isoprena, yaitu senyawa yang memang terdapat sebagai bahan alam, senyawa tersebut bukanlah pra zat in vivo. Senyawa yang sebenarnya terlibat adalah isopentenil pirofosfat, CH₂=C(CH₃)CH₂CH₂OPP, yang terbentuk dari asetat melalui asam mevalonat, CH₂OH-CH₂C(OH,CH₃)CH₂CO₂H. Isopentenil pirofosfat terdapat di dalam sel hidup dan berkesinambungan dengan isomernya, yaitu dimetilalil pirofosfat. Pada biosintesis, satu molekul isopentenil pirofosfat disambung dengan satu molekul dimetilalil pirofosfat membentuk geranil pirofosfat (C₁₀), yaitu senyawa antara yang merupakan kunci pada pembentukan monoterpena; kemudian geranil pirofosfat disambung lagi dengan isopentenil pirofosfat sehingga membentuk farnesil pirofosfat (C₁₅), yaitu senyawa antara pada sintesis seskuiterpena (Harborne, 1987).

Berbagai kombinasi satuan C₅, C₁₀, dan C₁₅ selanjutnya dapat terjadi pada sintesis terpenoid tinggi, misalnya triterpenoid terbentuk dari dua satuan farnesil dan karotenoid terbentuk karena penyambungan dua satuan geranil-geranil. Kebanyakan terpenoid alam mempunyai struktur siklik dan mempunyai satu gugus fungsi atau lebih (hidroksil,

karbonil, dll.) sehingga pada langkah akhir sintesis terjadi siklisasi dan oksidasi atau perubahan struktur lainnya (Harborne, 1987).

2.3 Tinjauan tentang Triterpenoid

Triterpenoid adalah senyawa yang kerangka karbonnya berasal dari enam satuan isoprena dan secara biosintesis diturunkan dari hidrokarbon C_{30} asiklik, yaitu skualena. Triterpenoid mempunyai struktur siklik yang kompleks yang terdiri dari alkohol, aldehida, atau asam karboksilat. Triterpenoid berbentuk kristal, tidak berwarna, terkadang titik leburnya tinggi dan sering kali bersifat optis aktif (Harborne, 1987).

Triterpenoid biasanya sulit diidentifikasi karena aktivitas kimianya kecil. Secara umum untuk mendeteksi ada atau tidaknya senyawa triterpenoid dan sterol maka digunakan pereaksi Libermann-Burchard. Triterpenoid dapat dibagi menjadi empat kelompok senyawa antara lain triterpen sebenarnya, steroid, saponin dan glikosida jantung (Harborne, 1987). Sejauh ini tidak ditemukan senyawa triterpenoid dengan struktur monosiklik dan bisiklik. Triterpenoid trisiklik jarang dijumpai, tetapi yang tetrasiklik cukup dikenal. Triterpenoid yang paling tersebar luas adalah triterpenoid pentasiklik. Beberapa contoh triterpenoid pentasiklik adalah ursan, lupan, oleanan, dan friedelan.

Steroid adalah triterpenoid yang memiliki cincin siklopentana perhidrofenantren yang terdiri dari 3 cincin beratom 6 C dan 1 cincin beratom 5 C. Dahulu, sterol sebagian besar terdapat pada sel hewan (hormon seks, asam empedu, dan lain-lain) tetapi akhir-akhir ini dapat ditemukan pada jaringan tanaman. Sterol yang biasanya terdapat pada jaringan tanaman disebut fitosterol, senyawa ini mungkin terdapat pada kebanyakan jaringan tanaman, di tanaman tingkat tinggi banyak ditemukan senyawa sterol yang disebut sitosterol, stigmasterol, dan kampesterol (Harborne, 1987).

Saponin merupakan glikosida triterpen dan sterol. Saponin telah terdeteksi pada lebih dari 90 suku tumbuhan. Saponin adalah senyawa aktif permukaan yang bersifat seperti sabun. Saponin dapat dideteksi berdasarkan kemampuannya membentuk busa dan menghemolisis sel darah (Harborne, 1987).

Golongan triterpenoid yang terakhir adalah glikosida jantung atau kardenolida. Sumber yang kaya akan glikosida jantung adalah anggota suku *Scrophulariaceae*, *Digitalis*, *Apocynaceae*, *Nerium*, *Moraceae* dan *Asclepiadaceae*, *Asclepias* (Harborne, 1987).

2.4 Tinjauan tentang Ekstrak

2.4.1 Definisi Ekstrak

Ekstrak adalah sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstraksi suatu senyawa dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan. Ekstrak cair adalah sediaan dari simplisia nabati yang mengandung etanol sebagai pelarut atau sebagai pengawet. Jika tidak dinyatakan lain pada masing - masing monografi tiap ml ekstrak mengandung senyawa aktif dari 1 g simplisia yang memenuhi syarat (Anonim, 2000).

2.4.2 Proses Pembuatan Ekstrak

Tahapan proses pembuatan ekstrak adalah :

1. Pembuatan serbuk simplisia

Pembuatan serbuk simplisia kering dengan peralatan tertentu sampai derajat kehalusan tertentu. Proses ini dapat mempengaruhi mutu ekstrak, karena semakin halus serbuk simplisia proses ekstraksi akan semakin efektif dan efisien tetapi semakin rumit teknologi peralatan yang dibutuhkan (Anonim, 2000).

2. Cairan pelarut

Cairan pelarut dalam proses pembuatan serbuk adalah pelarut yang optimal untuk zat kandungan berkhasiat, dengan demikian zat tersebut dapat dipisahkan dari zat kandungan lainnya serta ekstrak hanya mengandung sebagian besar zat kandungan yang diinginkan. Faktor utama untuk pertimbangan pada pemilihan cairan pelarut adalah :

- a) Selektifitas
- b) Kemudahan kerja dan proses dengan cairan tersebut
- c) Ekonomis
- d) Ramah lingkungan
- e) Keamanan (Anonim, 2000).

3. Separasi dan pemisahan

Tahapan ini bertujuan untuk menghilangkan zat yang tidak dikehendaki semaksimal mungkin tanpa dipengaruhi zat kandungan yang dikehendaki (Anonim, 2000).

4. Pemekatan dan penguapan

Pemekatan berarti meningkatkan jumlah atau konsentrasi zat terlarut dengan cara menguapkan pelarut sampai menjadi kandungan kering sehingga ekstrak menjadi kental atau pekat (Anonim, 2000).

5. Pengeringan ekstrak

Proses ini dilakukan dengan menghilangkan pelarut dari bahan sehingga menghasilkan serbuk, massa kering dan rapuh tergantung proses dan peralatan yang digunakan (Anonim, 2000).

2.4.3 Tinjauan tentang Metode Ekstraksi

Ekstraksi adalah kegiatan penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair. Simplisia yang diekstrak mengandung senyawa aktif yang dapat larut dan senyawa yang tidak dapat larut, seperti serat, karbohidrat, protein dan lain-lain. Struktur kimia yang berbeda-beda akan mempengaruhi kelarutan serta stabilitas senyawa-senyawa tersebut terhadap pemanasan, udara, cahaya, logam berat dan derajat keasaman. Dengan diketahuinya senyawa aktif yang dikandung simplisia akan mempermudah pemilihan pelarut dan cara ekstraksi yang tepat. Simplisia yang lunak seperti rimpang dan daun mudah diserap oleh pelarut, karena itu pada proses ekstraksi tidak perlu diserbuk sampai halus. Ada beberapa macam metode ekstraksi yang dapat digunakan, antara lain :

1. Ekstraksi dengan menggunakan pelarut

a. Cara dingin.

1) Maserasi

Maserasi adalah proses pengekstraksian 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. Remaserasi berarti dilakukan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama, dan seterusnya (Anonim, 2000).

2) Perkolasi

Perkolasi adalah suatu metode ekstraksi yang dilakukan dengan melewatkan pelarut secara perlahan sehingga pelarut tersebut dapat dapat menembus sampel bahan yang biasanya ditampung dalam suatu bahan kertas yang agak tebal dan berpori serta berbentuk seperti kantong atau sampel sampel ditampung dalam kantong yang terbuat dari kertas saring

b. Cara panas

1) Refluks

Refluks adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur pada titik didihnya, selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik (Anonim, 2000).

2) Soxhletasi

Soxhletasi merupakan ekstraksi berkesinambungan dengan jumlah pelarut yang relatif konstan dengan menggunakan alat ekstraktor Soxhlet yang dilengkapi dengan adanya pendingin balik (Anonim, 2000).

3) Digesti

Digesti adalah maserasi kinetik (dengan pengadukan kontinyu) pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur ruangan (kamar), yang secara umum dilakukan pada temperatur 40-50°C (Anonim, 2000).

4) Infusi

Infusi adalah ekstraksi dengan pelarut air pada temperatur penangas air (bejana infus tercelup ke dalam penangas air mendidih, temperatur terukur 96-98°C selama waktu tertentu (15-20 menit) (Anonim, 2000).

5) Dekoksi

Dekoksi adalah infusi pada waktu yang lebih lama ($\geq 30^\circ\text{C}$) dan temperatur sampai titik didih air (Anonim, 2000).

2. Destilasi uap

Destilasi uap adalah ekstraksi senyawa yang mudah menguap (minyak atsiri) dari bahan (segar atau simplisia) dengan uap air berdasarkan peristiwa tekanan partial senyawa yang mudah menguap dengan fase uap air dan ketel secara kontinyu sampai sempurna dan diakhiri dengan kondensasi fase uap campuran (senyawa mudah menguap ikut terdestilasi) menjadi destilat air bersama senyawa kandungan yang memisah sempurna atau memisah sebagian (Anonim, 2000).

2.5 Tinjauan tentang Kromatografi

2.5.1 Definisi Kromatografi

Kromatografi adalah sebuah metode untuk memisahkan suatu campuran menjadi beberapa komponennya. Kromatografi ini menggunakan solven yang disebut sebagai fase gerak yang melewati fase diam untuk memisahkan dua atau lebih komponen dari material yang dibawa oleh solven. Fase diam yang digunakan bisa berupa padat atau cair. Fase gerak yang digunakan bisa berupa cair atau gas. Dengan begitu, kromatografi dapat diklasifikasikan sebagai berikut: (a) cair-padat, (b) cair-cair, (c) gas-padat atau (d) gas-cair (Touchstone, 1983).

2.5.2 Kromatografi Lapis Tipis

KLT adalah metode kromatografi cair yang paling sederhana dimana teknik pemisahan komponen-komponen atas dasar perbedaan adsorpsi, partisi, bentuk ion maupun filtrasi. Namun yang paling penting dan umum adalah mekanisme pemisahan berdasarkan prinsip adsorpsi dan partisi oleh fase diam dibawah gerakan pelarut pengembang atau pelarut pengembang campur (Mulja and Suharman, 1995).

Fase diam yang umum dan banyak dipakai adalah silika gel yang dicampur dengan CaSO_4 untuk menambah daya lengket partikel silika gel pada pelat. Adsorben lain yang banyak dipakai adalah aluminium, kieselguhr, serbuk selulosa, serbuk poliamida, kanji dan sephadex. Pemilihan pelarut pengembang atau pelarut pengembang campur sangat dipengaruhi oleh macam dan polaritas zat - zat kimia yang dipisahkan (Mulja and Suharman, 1995).

Keuntungan KLT dibandingkan LC (*Liquid Chromatography*) antara lain adalah solven yang digunakan sedikit, polaritas solven dapat diubah dengan cepat dan sesuai keinginan, metodenya cepat dan mudah. Karena keuntungan itulah, maka KLT merupakan metode kromatografi yang paling mudah diterapkan untuk komponen senyawa secara spesifik (Touchstone, 1983).

Kromatogram pada KLT merupakan noda-noda yang terpisah setelah melihat kromatogram yang mengadsorpsi radiasi ultraviolet atau visualisasi dengan cara fisika atau cara kimia. Visualisasi cara fisika yaitu dengan cara berfluoresensi dengan radiasi ultraviolet pada $\lambda = 254 \text{ nm}$ atau $\lambda = 365 \text{ nm}$. Sedangkan visualisasi dengan cara kimia adalah dengan mereaksikan kromatogram dengan pereaksi warna yang memberikan warna atau fluoresensi yang spesifik. Pada kromatogram KLT dipakai istilah Faktor Retardasi (R_f) untuk kromatogram yang didefinisikan :

$$R_f = \frac{\text{Jarak migrasi komponen}}{\text{Jarak migrasi fase mobil}} \quad (\text{Mulja and Suharman, 1995}).$$

2.5.3 Kromatografi Cair Vakum

Kromatografi Cair Vakum digunakan untuk fraksinasi ekstrak tumbuhan secara kasar berhasil baik. Kromatografi ini melibatkan gradien eluasi dan ternyata efektif untuk memisahkan campuran bahan-bahan alam. Pemisahan dapat dilakukan dengan mudah dan cepat dengan kromatografi ini (Harborne, 1987; Hostettmann *et al.*, 1995).

Kolom kromatografi dikemas kering dalam keadaan vakum agar diperoleh kerapatan kemasan maksimum. Vakum dihentikan, pelarut yang kepolarannya rendah dituangkan ke permukaan penyerap lalu divakumkan lagi. Kolom dihisap sampai kering

dan sekarang siap dipakai. Cuplikan dilarutkan dalam pelarut yang cocok, mulai dengan pelarut yang kepolarannya rendah lalu kepolaran ditingkatkan perlahan-lahan, kolom dihisap sampai kering pada setiap pengumpulan fraksi (Harborne, 1987; Hostettmann *et al.*, 1995).

Faktor-faktor yang mempengaruhi pemisahan dengan kromatografi ini antara lain berat sampel, ukuran partikel fase diam, perbandingan tinggi kolom dan diameter kolom serta kecepatan alir fase diam (Harborne, 1987; Hostettmann *et al.*, 1995).

2.5.4 Kromatografi Kolom Lambat

Kromatografi kolom lambat telah lama dikenal sebagai suatu cara untuk memisahkan campuran zat. Pemisahan yang terjadi pada kromatografi kolom lambat berdasarkan perbedaan daya adsorpsi oleh fasa diam terhadap masing – masing komponen di dalam campuran. Zat – zat yang teradsorpsi lemah pada fase diam akan terbawa lebih dulu oleh cairan pengeluasi, sedang zat – zat yang teradsorpsi kuat pada fase diam akan terbawa kemudian (Heftman, 1983).

Zat penyerap (seperti aluminium oksida yang telah diaktifkan, silika gel, kieselguhr terkalsinasi dan kieselguhr kromatografi murni) dalam keadaan kering atau setelah dicampur dengan sejumlah cairan, dimampatkan ke dalam tabung kaca atau tabung kwarsa dengan ukuran tertentu dan mempunyai lubang pengalir keluar dengan ukuran tertentu.

Sejumlah sediaan yang diperiksa dilarutkan dengan sedikit pelarut kemudian ditambahkan pada puncak kolom dan dibiarkan mengalir ke dalam zat penyerap. Zat berkhasiat diserap dari larutan oleh bahan penyerap secara sempurna berupa pita sempit pada puncak kolom.

Dengan mengalirkan pelarut lebih lanjut, dengan atau tanpa tekanan udara, masing-masing zat bergerak turun dengan kecepatan khas hingga terjadi pemisahan pada kolom. Kecepatan bergerak zat dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti daya serap zat penyerap, sifat pelarut, dan suhu dari sistem kromatografi (Heftman, 1983).

2.6. Tinjauan Tentang Bakteri Percobaan

2.6.1. Klasifikasi

(Bakteri yang sensitif terhadap TBC (*Mycobacterium tuberculosis* H37RV ATCC 27294))

Kingdom : Bacteria

Filum : Actinobacteria

Ordo : Actinomycetales

Famili : Mycobacteriaceae

Genus : *Mycobacterium*

Spesies : *Mycobacterium tuberculosis*

2.6.2. Morfologi Bakteri

Dalam jaringan binatang, basil tuberkel merupakan batang ramping lurus berukuran kira-kira $0,4 \times 3 \mu\text{m}$. Pada perbenihan buatan, terlihat bentuk kokus dan filament.

Mikobacteria tidak dapat diklasifikasikan sebagai gram-positif atau gram-negatif. Sekali diwarnai dengan zat warna basa, warna tersebut tidak dapat dihilangkan dengan alkohol, meskipun diberikan yodium. Basil tuberkel yang sebenarnya ditandai oleh sifat tahan asam. Mikobakteria kaya akan lipid kompleks, asam lemak, dan lilin (Jawetz, 1991).

2.6.3. Perbiakan

Mycobacterium tuberculosis tumbuh pada 3 jenis perbenihan, yaitu perbenihan sintetik sederhana, perbenihan asam oleat albumin dan perbenihan organik kompleks. Bakteri ini tumbuh baik pada temperatur rendah (Jawetz, 1991).

2.6.4. Sifat-sifat Pertumbuhan

Kenaikan tekanan CO₂ dapat memperbesar pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis*. Bentuk saprofit cenderung tumbuh lebih cepat, berproliferasi dengan baik pada 22°C, menghasilkan lebih banyak pigmen, dan kurang tahan asam daripada bentuk yang patogen (Jawetz, 1991).

2.6.5. Epidemiologi dan Etiologi

Sumber infeksi yang paling sering adalah manusia yang mensekresi basil tuberkel dalam jumlah besar, terutama melalui saluran pernapasan, kontak yang rapat (misal dalam keluarga) dan kontak secara masif (misalnya tenaga kesehatan) yang menyebabkan penularan melalui inti droplet yang kemungkinan yang paling bisa terjadi. Cara untuk mencegah infeksi *Mycobacterium tuberculosis* adalah dengan imunisasi BCG dan tes tuberculin (Jawetz, 1991).

2.6.6. Patogenesis

Mycobacterium tuberculosis tidak menghasilkan toksin yang dikenal. Organisme dalam tetesan dari 1-5 µm dapat terhirup dan mencapai alveoli. Penyakit timbul akibat menetapnya dan berpoliferasinya organism virulen, serta adanya interaksi dengan tuan rumah. Kuman tidak virulen yang disuntikkan (misalnya, BCG) hanya dapat hidup selama beberapa bulan atau tahun pada tuan rumah normal (Jawetz, 1991).

2.7. Tinjauan Tentang Antibiotik untuk Tubekulosis

Antibiotik adalah zat yang dihasilkan suatu mikroba, terutama fungi yang dapat menghambat atau membasmi mikroba jenis lain. Antibiotika harus mempunyai toksisitas selektif setinggi mungkin artinya, antibiotik harus bersifat sangat toksik untuk mikroba, namun relatif tidak toksik untuk hospes.

Dalam penelitian ini digunakan antibiotika etambutol sebagai kontrol positif untuk *Mycobacterium tuberculosis*. Etambutol merupakan serbuk hablur putih, sangat mudah larut dalam air, larut dalam etanol dan dalam metanol, sedikit larut dalam kloroform dan dalam eter (Anonim, 1995).

Hampir semua galur *Mycobacterium tuberculosis* sensitif terhadap etambutol. Antibiotik ini tidak efektif untuk kuman lain dan bekerja dengan cara menekan pertumbuhan kuman tuberkulosis yang telah resisten terhadap isoniazid dan streptomisin.

Mekanisme kerja dari etambutol adalah menghambat sintesis RNA sehingga metabolisme sel terhambat dan sel mati (Sulistia, 1995).

2.8. Metode Penentuan Aktivitas Antibakteri

Terdapat tiga macam metode pengujian aktivitas antibakteri, yaitu :

1. Metode penyebaran (*diffusion method*)
 - Metode cakram kertas (*paper disk method*)
 - Metode cairan dalam cincin (*ring diffusion method*)
 - Metode lubang (*hole plate method*)
2. Metode pengenceran (*dilution method*)
 - Metode pengenceran agar (*agar dilution method*)
 - Metode pengenceran tabung (*tube dilution method*)
3. Metode bioautografi (*bioautography method*)
 - Metode bioatografi kontak (*contact bioautography method*)
 - Metode bioatografi langsung (*direct bioautography method*)
 - Metode bioautografi pencelupan (*immersion bioautography method*) (Bergne *et al.*, 1998).

2.8.1. Metode Penyebaran

Metode ini dilakukan dengan cara menanam bakteri dalam media agar padat yang sesuai. Selanjutnya diletakkan cakram atau silinder yang telah ditetesi dengan bahan uji yang dimasukkan dalam lubang agar yang telah dibuat pada media yang berisi inokulum bakteri dan bahan uji diinkubasi pada suhu 36-37°C selama 18-24 jam. Aktivitas antibakterinya terlihat dengan mengukur daerah sekitar cakram, yaitu lubang yang tidak ditumbuhi bakteri. Makin besar diameter daerah hambatan pertumbuhan tersebut berarti aktivitas bahan uji terhadap bakteri makin baik (Bergne *et al.*, 1998).

2.8.2. Metode Pengenceran

Metode pengenceran dilakukan dengan pengenceran dalam tabung reaksi, petri kecil dan dengan lempeng mikroliter dengan 96 lubang. Cara pengenceran dalam tabung dilakukan dengan pengenceran bahan uji dengan media cair menjadi kelipatan dua secara bertahap sehingga didapat beberapa konsentrasi dengan kelipatan setengahnya. Pengenceran agar menggunakan satu seri lempeng agar dengan kosentrasi bahan uji yang berbeda. Selanjutnya diinokulasi dengan suspensi bakteri dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 36-37°C. Kemudian diamati hambatan pertumbuhan kuman dengan membandingkan kekeruhan atau pertumbuhan dengan kontrol yang mengandung media. Konsentrasi hambat minimal didapat pada tabung yang jernih pada pengenceran tertinggi. Metode ini digunakan untuk mengetahui harga kadar hambatan minimal suatu bahan antibakteri (Bergne *et al.*, 1998).

2.8.3. Metode Bioautografi

Metode ini sangat berguna untuk mengetahui senyawa baru atau yang belum diketahui aktivitas antibakterinya. Bahan uji dipindahkan ke dalam cawan petri yang berisi

agar dan diinokulum bakteri melalui proses difusi. Bioautografi kontak menggunakan prinsip difusi senyawa yang terpisah dengan kromatografi lapis tipis atau kromatografi kertas.

Lempeng kromatografi ditempelkan pada media yang telah diinokulasi dengan mikroba. Setelah 15-30 menit lempeng dipindahkan, diinkubasi dan diamati senyawa antibakteri yang berdifusi pada lapisan agar dan menghambat pertumbuhan bakteri. Pada bioautografi langsung, zona hambatan diamati secara langsung pada lempeng kromatografi yang telah disemprot suspensi bakteri dalam media cair dan diinkubasi pada suhu dan waktu yang sesuai. Sedangkan metode bioautografi pencelupan dilakukan dengan mencelupkan lempeng kromatografi ke dalam media yang telah diinokulasi bakteri, setelah media yang menempel pada lempeng kromatografi mengeras diinkubasi dan dilakukan pengamatan daerah hambatan (Paxton, 1991).

2.9. Tinjauan Tentang Metode yang Digunakan

Pada penentuan efek antimikroba fraksi dari ekstrak *n*-heksana dan ekstrak metanol umbi bidara upas *Merremia mammosa* Hall digunakan metode dilusi agar. Konsentrasi Hambat Minimum dinyatakan dalam satuan $\mu\text{g/ml}$. Bahan antimikroba diuji dengan cara pengenceran lipat dua secara berseri dan konsentrasi terendah yang menghambat pertumbuhan kasat mata dari suatu mikroorganisme dicatat sebagai konsentrasi hambat minimum. Jangka waktu konsentrasi uji dapat beragam tergantung bahan uji dan mikroorganisme uji yang digunakan. Keuntungan dari metode ini adalah fleksibilitasnya, juga memungkinkan untuk digunakan dalam studi antimikroba bagi senyawa mudah larut dan tak mudah larut (Rios *et al*, 1988).

BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

III. 1. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk:

- Mengetahui aktivitas antimikroba fraksi-fraksi ekstrak *n*-heksana dan metanol umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.) Hallier f.) terhadap *Mycobacterium tuberculosis* H37RV ATCC 27294.
- Menentukan Konsentrasi Hambat Minimum fraksi ekstrak *n*-heksana dan metanol umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.) Hallier f.) terhadap *Mycobacterium tuberculosis* H37RV ATCC 27294

III. 2. Manfaat Penelitian

Diharapkan dari penelitian ini diperoleh data ilmiah tentang fraksi ekstrak *n*-heksana dan metanol yang aktif sebagai antimikroba terhadap *Mycobacterium tuberculosis* H37RV ATCC 27294 yang selanjutnya dapat dikembangkan dan dimanfaatkan dalam pembuatan suatu sediaan fitofarmaka yang dapat menjadi obat alternatif penyakit tuberkulosis.

BAB IV. METODE PENELITIAN

4.1. Bahan

4.1.1. Bahan tanaman

Bahan baku untuk percobaan berupa umbi *Merremia mammosa* Hall yang diperoleh dari Sampang, Madura, JATIM.

Umbi dicuci dengan air bersih, ditiriskan sampai kering, kemudian diiris-iris melintang dengan ketebalan antara 6-10 mm. kemudian di keringkan di bawah sinar matahari langsung sampai kering. umbi yang sudah kering ditumbuk sampai halus, lalu diayak. Serbuk umbi yang telah halus ini selanjutnya dipakai sebagai bahan penelitian (Anonim, 1985).

4.1.2. Bakteri Uji dan Hewan Coba

Bakteri yang digunakan pada penelitian ini bakteri yang sensitif TBC yaitu *Mycobacterium tuberculosis* H37RV ATCC 27294. Bakteri diperoleh dari persediaan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga

4.1.3. Bahan Kimia

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Tween 80, Dimetil Sulfoksida (DMSO), Middlebrook agar 7H9 dan 7H10, CMC-Na untuk uji antimikroba. Sedangkan untuk proses fraksinasi dibutuhkan bahan *n*-heksana teknis, etil asetat teknis, kloroform proanalisis, pereaksi anisaldehida H₂SO₄ pekat dan pereaksi Liebermann-Burchard, serbuk silika gel 60 GF₂₅₄ Merck (0,063-0,200 mm dan 0,200-0,500 mm), pelat KLT dan kaca silika gel 60 GF₂₅₄ Merck, dan ethanol

4.2. Alat-alat

Alat-alat yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah wadah maserator, sintered glass Schoot Jena glass diameter 5 cm, rotary Evaporator Buchi R-200, lampu UV Camag 254 nm dan 365 nm, penyemprot noda, spektrofotometer UV-Vis HP 8452 A Single beam, Diode Array , perkin Elmer Spectrum One FT-IR Spectrometer, LAF Cabinet, cawan petri, pinset, tabung reaksi tertutup, lemari pengeram, kapas penghapus steril, jarum ose, vortex, Kit Aspartat Amino Trans aminase (AST) dari Merck, Kit Alanin Amino Transaminase (ALT) dari Merck, dan Venoject EDTA steril

4.3. Rancangan Penelitian

Adapun rancangan penelitian yang akan dilakukan adalah sebagai berikut:

1. Penyiapan bahan

Bahan yang akan digunakan adalah umbi *M. mammosa* Hall yang diperoleh dari daerah Sumenep, Madura, Jawa Timur yang diambil pada bulan April 2009.

2. Ekstraksi bahan

Serbuk umbi *M. mammosa* Hall dimaserasi dengan pelarut *n*-heksana agar senyawa yang bisa larut dengan *n*-heksana terutama senyawa nonpolar bisa tertarik/larut dengan

n-heksana. Ampas umbi bidara upas yang didapat setelah proses maserasi dengan pelarut *n*-heksana dilakukan maserasi lanjut dengan pelarut metanol

3. Fraksinasi ekstrak *n*-heksana dan metanol

Fraksinasi ekstrak dilakukan dengan metode kromatografi cair vakum. Pemilihan eluen dilakukan berdasarkan data hasil skrining fitokimia terdahulu, yaitu eluen untuk senyawa golongan terpenoid pada ekstrak *n*-heksana dan senyawa flavonoid pada ekstrak metanol.

4. Uji daya hambat bakteri sensitif TBC (*Mycobacterium tuberculosis*).

Hasil fraksinasi dari ekstrak *n*-heksana dan ekstrak metanol kemudian dilakukan uji daya hambat terhadap bakteri sensitif TBC (*Mycobacterium tuberculosis*) dengan metode dilusi agar. Pada uji ini juga ditentukan konsentrasi hambat minimum (KHM).

4.4. Tahapan Kerja

4.4.1. Penyiapan bahan

Umbi bidara upas segar dicuci sampai bersih, lalu dikeringkan dengan cara diangin-anginkan dibawah sinar matahari secara tidak langsung. Setelah simplisia kering, kemudian digiling sehingga diperoleh serbuk yang halus.

4.4.2. Ekstraksi serbuk

Serbuk halus diekstraksi dengan cara maserasi, yaitu perendaman dengan pelarut *n*-heksana dalam wadah gelas. Perendaman dilakukan selama 24 jam dan disaring vakum dengan corong Buchner. Proses maserasi ini dilakukan berulang-ulang selama 4-5 kali. Penghentian proses dilakukan setelah filtrat hasil penyaringan tidak menunjukkan noda pada pemeriksaan dengan metode kromatografi lapis tipis untuk senyawa golongan terpenoid. KLT dilakukan dengan penampak noda anisaldehyd sulfat. Filtrat hasil penyaringan selanjutnya diuapkan dalam alat rotary evaporator hingga menjadi ekstrak kental.

Ampas sisa penyarian direndam dengan pelarut metanol dalam wadah gelas. Perendaman dilakukan selama 24 jam dan selanjutnya disaring vakum dengan corong Buchner. Proses maserasi dilakukan berulang dan dihentikan setelah filtrat hasil penyaringan tidak menunjukkan noda berwarna kuning pada pemeriksaan dengan metode kromatografi lapis tipis untuk senyawa golongan flavonoid. Filtrat diuapkan dalam alat rotary evaporator hingga menjadi ekstrak kental.

4.4.3. Fraksinasi ekstrak *n*-heksana dan metanol

Pemisahan/fraksinasi dari ekstrak *n*-heksana lebih lanjut dilakukan dengan metode Kromatografi Cair Vakum menggunakan fase gerak kombinasi pelarut *n*-heksana-etil asetat dengan perbandingan secara gradien. Kemudian terhadap fraksi yang diperoleh dilakukan uji KLT dan fraksi yang menunjukkan noda yang sama digabung menjadi satu. Selanjutnya dipilih fraksi yang akan dipakai untuk uji daya hambat bakteri sensitif TBC (*Mycobacterium tuberculosis*).

Pemisahan/fraksinasi dari ekstrak metanol dilakukan dengan metode kromatografi cair vakum menggunakan fase gerak kombinasi pelarut kloroform-metanol dengan perbandingan secara gradien. Terhadap fraksi yang diperoleh dilakukan uji KLT dan fraksi

yang menunjukkan noda yang sama digabung menjadi satu. Selanjutnya dipilih fraksi yang akan dipakai untuk uji daya hambat bakteri sensitif TBC (*Mycobacterium tuberculosis*).

4.4.4 Uji Daya Hambat *Mycobacterium tuberculosis*

4.4.4.1 Penyiapan Media

(Pembuatan suspensi bakteri sensitif TBC (*Mycobacterium tuberculosis* H37RV ATCC 27294) yang setara dengan McFarland 1,0 (10^8 CFU/ml)

Satu ose penuh koloni bakteri sensitif TBC (*Mycobacterium tuberculosis*) diambil dari biakannya pada medium Lowenstein-jenssen yang berumur 3 minggu kemudian dimasukkan dalam media cair Middlebrook 7H9, divortex \pm 1 menit, disetarakan kekeruhannya dengan Mcfarland 1,0. Kekeruhannya diukur dengan spektrofotometer *Bausch and Lomb Spectronic* pada λ 580 nm sampai diperoleh transmittan 25% sehingga diperoleh suspensi yang mengandung 10^8 mikroba/ml.

Pembuatan Suspensi Dilusi Bakteri

Dilusi 1ml suspensi *Mycobacterium tuberculosis* menjadi 10^7 CFU/ml dalam media cair 9 ml Middlebrook 7H9.

4.4.4.2. Pembuatan Kontrol Positif

Kontrol positif yang digunakan untuk bakteri adalah etambutol dengan kadar 10 μ g/ml. Dibuat larutan baku induk etambutol 100 μ g/ml dengan menimbang 20 mg etambutol ditambahkan DMSO 36 ml dan 4 ml Tween 80 serta aquades sampai 200 ml dalam labu ukur. Dari larutan tersebut diambil 1 ml yang dimasukkan dalam tabung dan ditambahkan dengan 9,0 ml media, diaduk sampai homogen. Campuran dimasukkan ke dalam cawan petri dan dibiarkan pada suhu kamar sampai memadat.

4.4.4.3. Pembuatan Kontrol negatif

Kontrol negatif pertama dibuat dengan mencampur 1 ml larutan pengencer dengan 9,0 ml media, diaduk sampai homogen kemudian dimasukkan kedalam cawan petri dan dibiarkan pada suhu kamar sampai memadat sehingga konsentrasi akhir (Tween 80 dan DMSO) dalam media adalah 2%.

4.4.4.3. Pembuatan Larutan Uji

Sampel berupa fraksi ekstrak *n*-heksana dan metanol terpilih perlu ditambahkan Tween 80 untuk membantu mendispersikan bahan yang bersifat non polar (Rios *et al.* 1988). Pada penelitian ini pelarut yang digunakan adalah DMSO dan Tween 80.

Larutan uji dibuat dari fraksi ekstrak *n*-Heksana dan ekstrak metanol masing-masing dengan konsentrasi 8000 μ l, 4000 μ l, 2000 μ l, 1000 μ l, 500 μ l. Pengenceran menggunakan pelarut dimana 100 ml pelarut pengencer mengandung 2 ml Tween 80, 18 ml DMSO, dan 80 ml air steril.

3.4.4.2. Uji Kepekaan

3.4.4.2.1. Kontrol Positif (Etambutol)

Suspensi bakteri (10^7 CFU/ml) dilusi 1 ml ke dalam tabung ditambah 1 ml ethambutol kemudian ditambah media sampai volume 8 ml.

3.4.4.2.2. Kontrol Negatif

Suspensi bakteri A (10^7 CFU/ml) dilusi 1 ml ke dalam tabung, ditambah 1 ml campuran DMSO dan Tween 80 kemudian ditambah media sampai volume 8 ml.

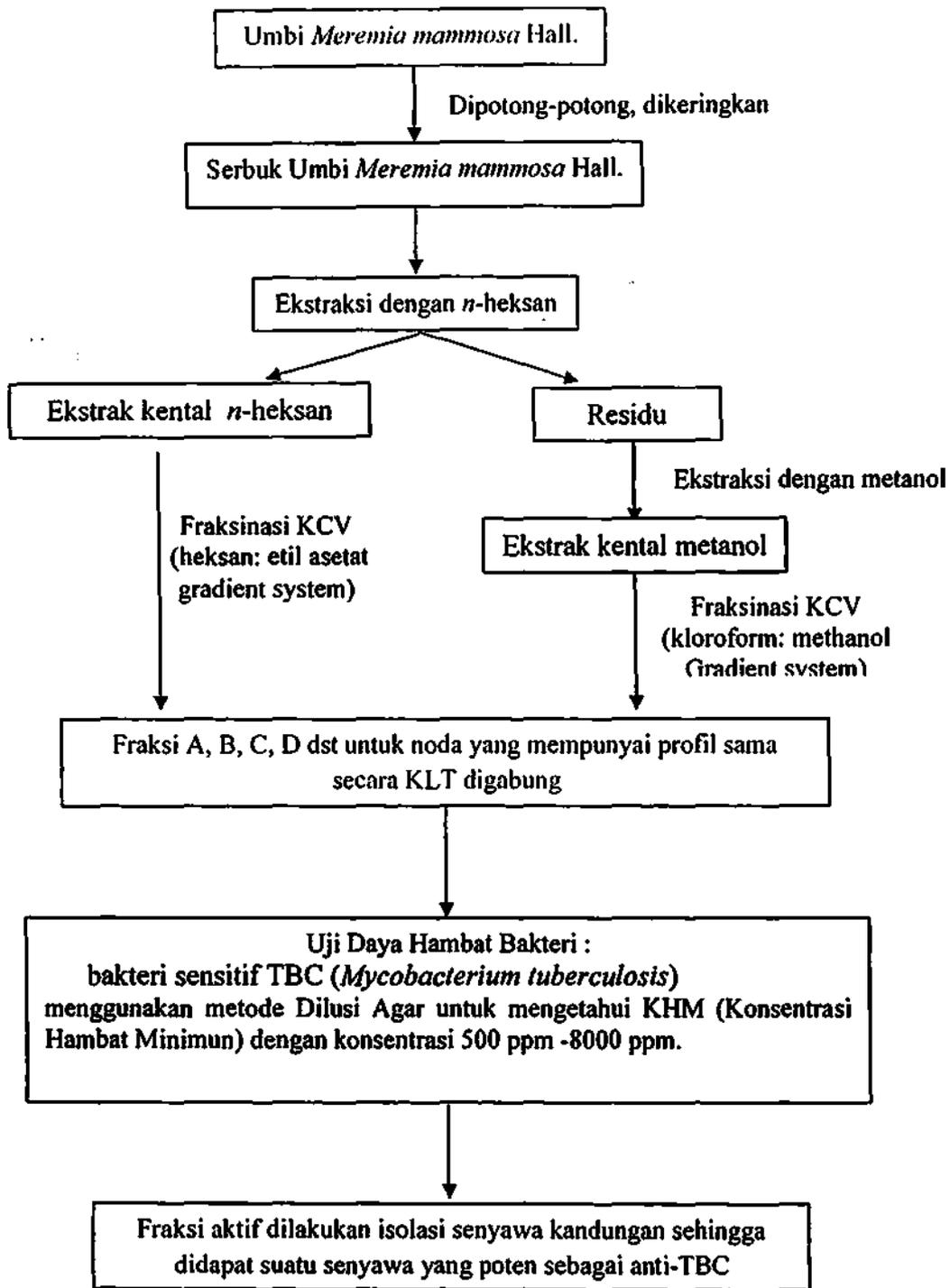
3.4.4.2.3. Larutan Uji (Fraksi dari ekstrak *n*-heksana dan metanol)

Dilakukan dilusi fraksi ekstrak *n*-heksana dan metanol konsentrasi 8000 ppm, 4000 ppm, 2000 ppm, 1000 ppm, 500 ppm. Suspensi bakteri (10^7 CFU/ml) diambil 1 ml ke dalam tabung ditambah 1 ml larutan ekstrak kemudian ditambah media sampai 8 ml.

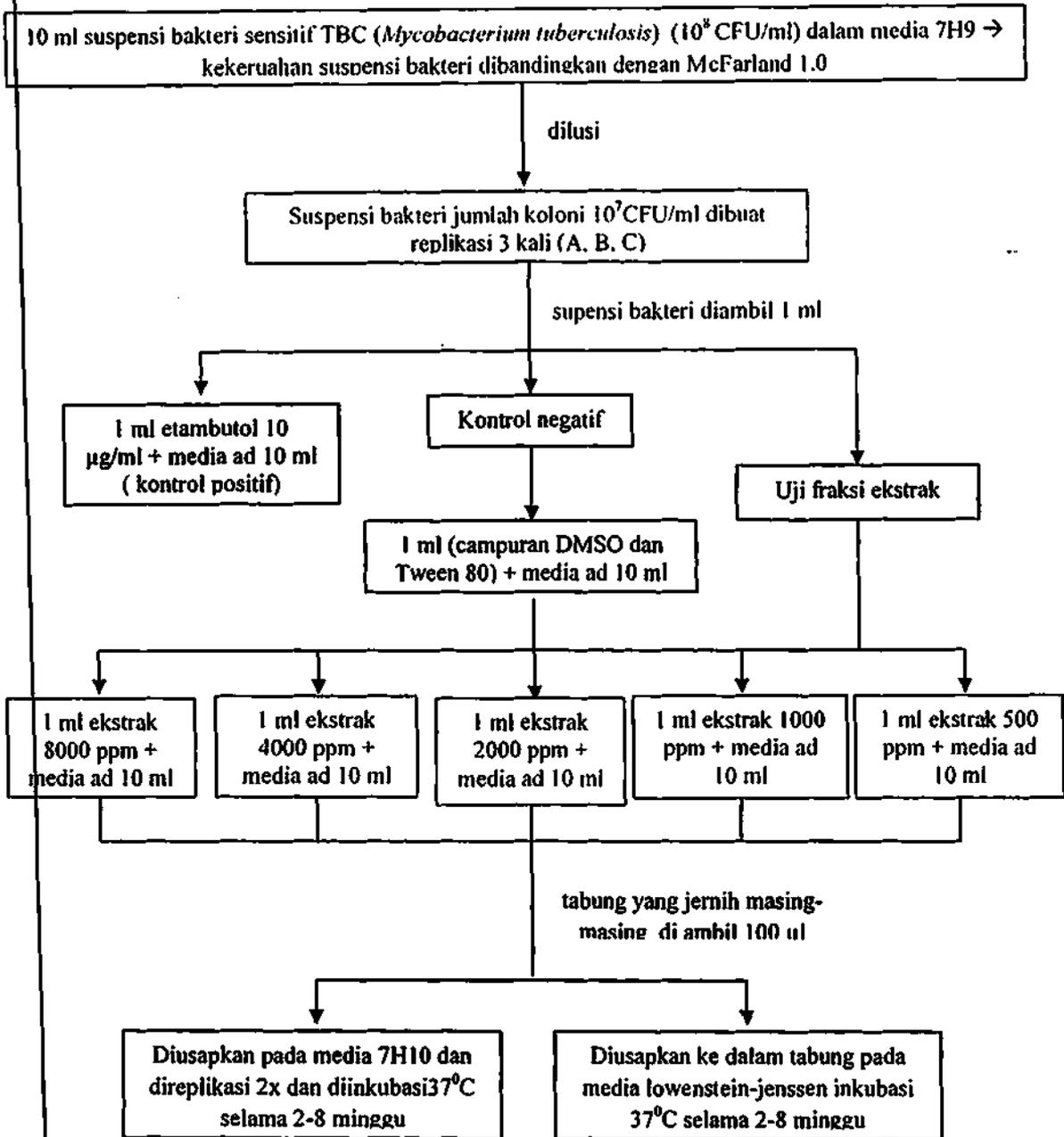
Suspensi bakteri sensitif TBC (*Mycobacterium tuberculosis*) dan kontrol yang sudah ditambahkan bahan uji dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 7 hari. Kemudian dilakukan subkultur dari tabung uji diambil 100 μl pada media padat Middlebrook 7H10 dan Lowenstein – Jenson, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C (CO_2 inkubator) selama 2-8 minggu.

Pertumbuhan koloni yang positif dilakukan uji mikroskopis BTA dan uji niasin untuk identifikasi bakteri sensitif TBC (*Mycobacterium tuberculosis*). Untuk media yang tidak memberikan pertumbuhan dicatat sebagai adanya hambatan pertumbuhan kuman (bakterisidal). Pada tabung dengan konsentrasi terendah yang menunjukkan hambatan dinyatakan sebagai KHM.

Skema kerja Ekstraksi dan Fraksinasi:



Skema Kerja Uji daya hambat anti bakteri sensitif TBC (*Mycobacterium tuberculosis*) dan bakteri resisten TBC :



V. HASIL DAN PEMBAHASAN

Fraksinasi dan Uji Aktivitas Ekstrak *n*-Heksana

5.1. Penyiapan Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.) Hallier f.) yang diambil dari Sumenep-Madura, Jawa Timur. Tanaman ini dideterminasi di Kebun Raya Purwodadi. Umbi bidara upas yang diperoleh kemudian dicuci, diiris tipis dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Setelah kering, umbi diserbuk kemudian serbuk yang diperoleh ditimbang.

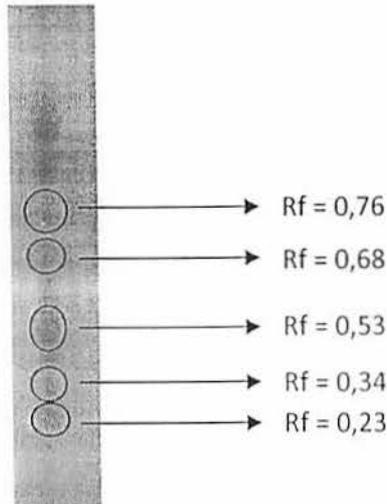
5.2. Ekstraksi Bahan

Serbuk umbi bidara upas sebanyak 1,620 kg kemudian dimaserasi dengan pelarut *n*-heksana sebanyak 9 kali (masing-masing wadah berisi serbuk \pm 500 gram dimaserasi dengan pelarut *n*-heksana 1,5 liter). Pengujian dengan KLT pada remaserasi ke-9 menunjukkan tidak ada noda intensif berwarna ungu atau merah ungu yang berarti senyawa terpenoid di dalam umbi *Merremia mammosa* (Lour.) Hallier f. sudah terekstraksi secara sempurna. Hasil maserasi berupa massa cair berwarna coklat. Setelah diuapkan dengan rotavapour, diperoleh ekstrak kental berwarna coklat sebanyak 56,9589 gram.

5.3 Skrining Fitokimia Terpenoid dan Triterpenoid Ekstrak *n*-heksana

5.3.1. Skrining Fitokimia Terpenoid

Hasil eluasi ekstrak *n*-heksana dengan fase gerak *n*-heksana : etil asetat = 4 : 1 dengan penampak noda anisaldehyd- H_2SO_4 menghasilkan 5 noda intensif berwarna merah ungu yang positif terpenoid. Kromatogram hasil pemeriksaan ekstrak *n*-heksana terhadap terpenoid dengan Kromatografi Lapis Tipis dengan fase diam silika gel 60 GF₂₅₄ Merck dapat dilihat pada gambar 5.1. h. Noda hasil KLT beserta dengan harga R_f tertera pada tabel V.1. h.



Gambar 5.1. h. Kromatogram Lapis Tipis ekstrak *n*-heksana umbi *Merremia mammosa* (Lour.) Hallier f. dengan fase gerak *n*-heksana : etil asetat (4:1), fase diam silika gel 60 GF₂₅₄ Merck dengan penampak noda anisaldehyda-H₂SO₄.

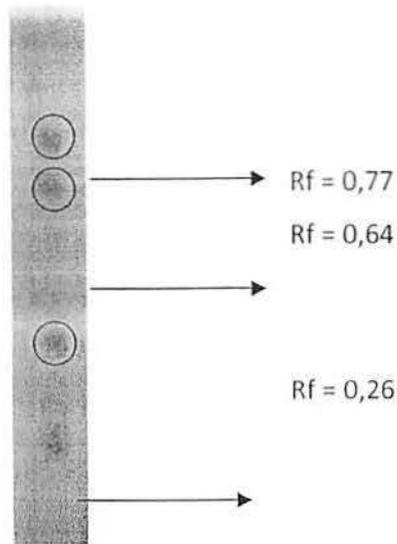
Tabel V.1. h. Hasil KLT skrining fitokimia terpenoid ekstrak *n*-heksana umbi *M. mammosa* (Lour.) Hallier f. dengan penampak noda anisaldehyd-H₂SO₄

No.	R _f noda	Warna noda
1.	0, 76	Merah ungu
2.	0, 68	Merah ungu
3.	0, 53	Merah ungu
4	0,34	Merah ungu
5	0,23	Merah ungu

5.3.2. Skrining Fitokimia Triterpenoid

1). Reaksi Liebermann-Burchard

Hasil eluasi ekstrak *n*-heksana dengan fase gerak *n*-heksana : etil asetat = 4 : 1 dengan penampak noda Liebermann-Burchard menghasilkan 3 noda intensif berwarna merah muda dan berpendar merah muda di bawah lampu UV 366 nm yang positif triterpenoid. Kromatogram hasil pemeriksaan ekstrak *n*-heksana terhadap triterpenoid dengan Kromatografi Lapis Tipis dengan fase diam silika gel GF₂₅₄ Merck dapat dilihat pada gambar 5.2. h. Noda hasil KLT beserta dengan harga R_f tertera pada tabel V.2. h.



Gambar 5.2. h. Kromatogram Lapis Tipis ekstrak *n*-heksana umbi *M.mamosa* (Lour.) Hallier f. dengan fase gerak *n*-heksana : etil asetat (4:1), fase diam silika gel 60 GF₂₅₄ Merck dengan penampak noda Liebermann-Burchard

Tabel V.2. h. Hasil KLT skrining fitokimia triterpenoid ekstrak *n*-heksana umbi *M.mamosa* (Lour.) Hallier f. dengan penampak noda Liebermann-Burchard

No.	R _f noda	Warna noda
1.	0, 77	Merah muda
2.	0, 64	Merah muda
3.	0, 26	Merah muda

2). Uji Salkowski

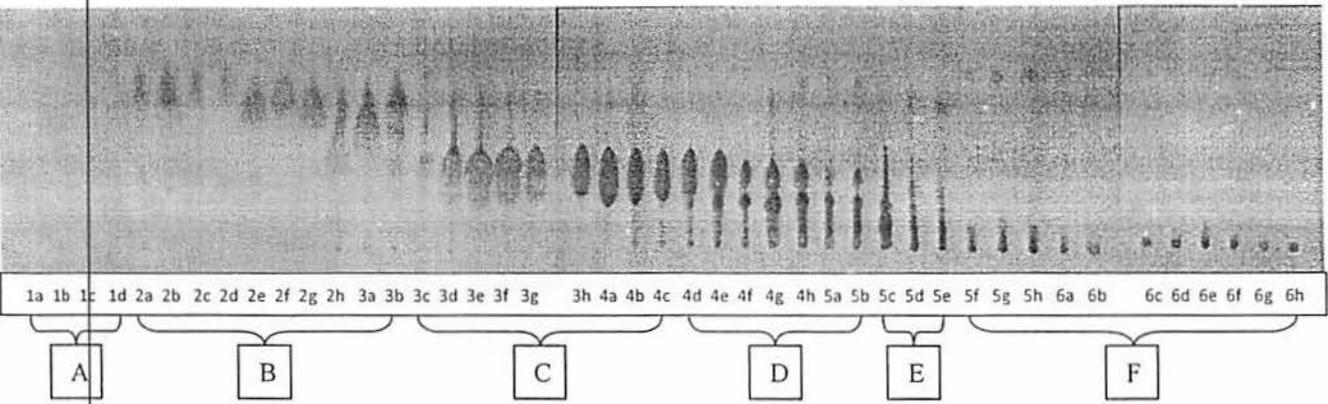
Hasil Uji Salkowski dari ekstrak menunjukkan terbentuknya cincin merah. Gambar uji Salkowski ekstrak *n*-heksana dapat dilihat pada gambar 5.3. h. dibawah ini:



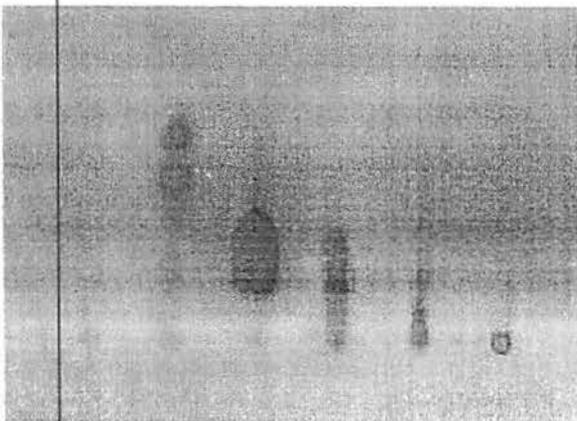
Gambar 5.3. h. Uji Salkowski ekstrak *n*-heksana

5.4. Pemisahan dengan Kromatografi Cair Vakum

Hasil pemisahan 15 gram ekstrak *n*-heksana yang terdiri dari dua kali proses Kromatografi Cair Vakum (masing-masing proses 7,5 gram ekstrak) dengan eluasi gradien dari *n*-heksana 100% sampai dengan *n*-heksana : etil asetat = 50 % : 50% (dengan penurunan kadar *n*-heksana sebanyak 10%). Masing-masing perbandingan eluen dilakukan 8 kali dengan volume masing-masing 25 ml, namun pada eluasi dengan *n*-heksana 100% dilakukan sebanyak 4 kali dengan volume masing-masing 50 ml sehingga didapatkan 44 fraksi yang kemudian dikumpulkan menjadi 6 fraksi yaitu A (1a – 1d), B (2a – 3b), C (3c – 4c), D (4d – 5b), E (5c – 5e) dan F (5f – 6h). Kromatogram hasil analisis KLT di atas diperoleh dengan fase diam silika gel 60 GF₂₅₄ Merck, fase gerak *n*-heksana : etil asetat (4:1) serta penampak noda anisaldehida-H₂SO₄ seperti yang terlihat pada gambar 5.4.h dan 5.5. Jumlah noda beserta harga R_f hasil KLT tertera pada tabel V.3.h.



Gambar 5.4.h. Kromatogram Lapis Tipis 44 fraksi hasil pemisahan ekstrak *n*-heksana dengan Kromatografi Cair Vakum, fase gerak *n*-heksana : etil asetat (4:1), fase diam silika gel 60 GF₂₅₄ Merck dengan penampak noda anisaldehida-H₂SO₄



Gambar 5.5.h. Kromatogram Lapis Tipis 6 fraksi hasil penggabungan fraksi dari pemisahan ekstrak *n*-heksana dengan Kromatografi Cair Vakum, fase gerak *n*-heksana : etil asetat (4:1), fase diam silika gel 60 GF₂₅₄ Merck dengan penampak noda anisaldehida-H₂SO₄

A B C D E F

Tabel V.3. h. Hasil KLT penggabungan fraksi dari fraksi hasil pemisahan ekstrak *n*-heksana dengan Kromatografi Cair Vakum

No	Berat (mg) KCV 1	Berat (mg) KCV 2	Jumlah Noda	R _f	Warna Noda
A (1a - 1d)	48,0	54,7	1	0,74	Merah ungu
B (2a - 3b)	456,1	833,6	4	0,67	Merah ungu
				0,52	Merah ungu
				0,41	Merah ungu
				0,24	Merah ungu
C (3c - 4c)	872,1	872,3	5	0,62	Merah ungu
				0,51	Merah ungu
				0,36	Merah ungu
				0,27	Merah ungu
				0,19	Merah ungu
D (4d - 5b)	378,7	463,1	5	0,73	Merah ungu
				0,55	Merah ungu
				0,32	Merah ungu
				0,24	Merah ungu
				0,19	Merah ungu
E (5c - 5e)	183,3	267,6	2	0,23	Merah ungu
				0,14	Merah ungu
F (5f - 6h)	250,0	100,5	1	0,73	Merah ungu

5.5. Uji Aktivitas Antimikroba

5.5.1. Uji Aktivitas Antimikroba Fraksi *n*-Heksana dengan Metode Dilusi Agar

Pada penelitian ini dilakukan pengujian awal aktivitas antimikroba fraksi B, C, D, E, dan F terhadap *Mycobacterium tuberculosis* H37RV ATCC 27294 menggunakan metode pengenceran agar (*Agar Dilution Method*) dengan konsentrasi 400 µg/ml. Hasil pengujian tersebut menunjukkan bahwa pada fraksi E positif terdapat hambatan pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* H37RV ATCC 27294 (Gb.5.6.h, Tabel V.4.h).

Tabel V.4.h. Hasil Uji Aktivitas Antimikroba Fraksi *n*-Heksana terhadap *Mycobacterium tuberculosis* H37RV ATCC 27294

Fraksi	Konsentrasi Larutan Uji ($\mu\text{g/ml}$)	Hasil	
		Replikasi 1	Replikasi 2
B	400	-	-
C		-	-
D		-	-
E		+	+
F		-	-
Kontrol Positif (etambutol)	10	+	
Kontrol Negatif	DMSO 2% dan Tween 1%	-	

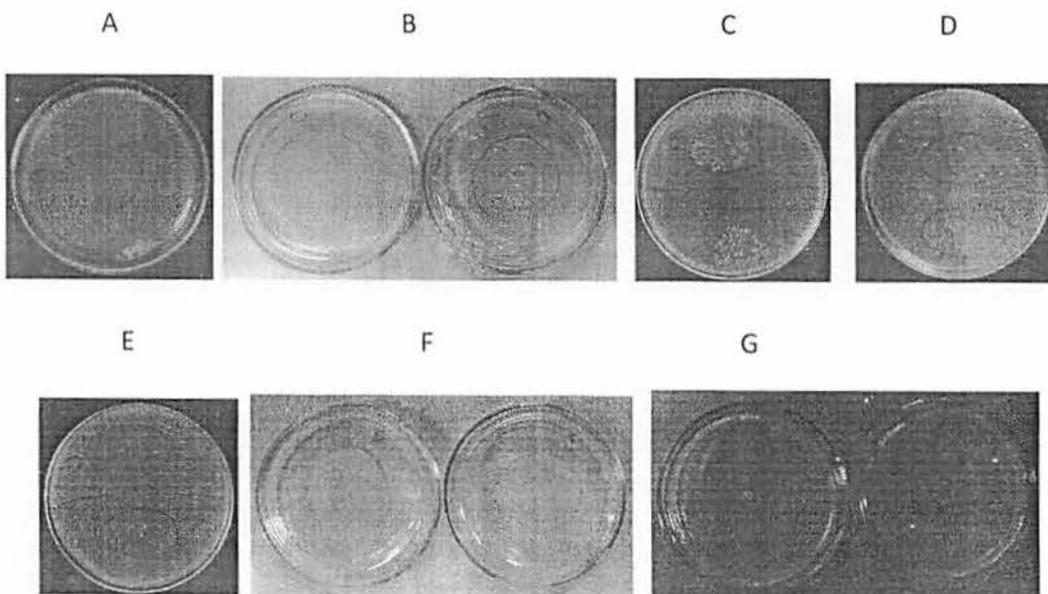
Keterangan:

(+) : Terdapat hambatan pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* H37RV ATCC 27294

(-) : Tidak terdapat hambatan pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* H37RV ATCC 27294

Kontrol (+) : Etambutol 10 $\mu\text{g/ml}$

Kontrol (-) : Campuran media dengan DMSO dan Tween 80

Gambar 5.6.h. Hasil Uji Aktivitas Antimikroba Fraksi *n*-Heksana terhadap *Mycobacterium tuberculosis* H37RV ATCC 27294

Keterangan:

Gambar A : Kontrol positif mengandung etambutol 10 µg/ml

Gambar B : Kontrol negatif mengandung campuran media dengan DMSO dan Tween 80

Gambar C : Fraksi B ekstrak *n*-heksana umbi bidara upas konsentrasi 400 µg/ml

Gambar D : Fraksi C ekstrak *n*-heksana umbi bidara upas konsentrasi 400 µg/ml

Gambar E : Fraksi D ekstrak *n*-heksana umbi bidara upas konsentrasi 400 µg/ml

Gambar F : Fraksi E ekstrak *n*-heksana umbi bidara upas konsentrasi 400 µg/ml

Gambar G : Fraksi F ekstrak *n*-heksana umbi bidara upas konsentrasi 400 µg/ml

5.3.2. Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) Aktivitas Antimikroba Fraksi *n*-Heksana dengan Metode Dilusi Agar

Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) fraksi E ekstrak *n*-heksana umbi bidara upas dilakukan menggunakan larutan uji dengan konsentrasi 400–12,5 µg/ml. Pengujian tersebut menunjukkan hasil positif yaitu adanya hambatan pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* H37RV ATCC 27294. Hasil pengujian tersebut menunjukkan bahwa pada konsentrasi larutan uji 400–12,5 µg/ml tidak terdapat pertumbuhan bakteri sehingga belum bisa ditentukan harga KHM-nya ((Gb.5.7 h ,Tabel V.5.h).

Tabel V.5.h. Hasil Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) Fraksi *n*-Heksana terhadap *Mycobacterium tuberculosis* H37RV ATCC 27294

Fraksi	Konsentrasi Larutan Uji (µg/ml)	Hasil		
		Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3
E1	400	+	+	+
E2	200	+	+	+
E3	100	+	+	+
E4	50	+	+	+
E5	25	+	+	+
E6	12,5	+	+	+
Kontrol Positif (etambutol)	10	+		
Kontrol Negatif	DMSO 2% dan Tween 1%	-		

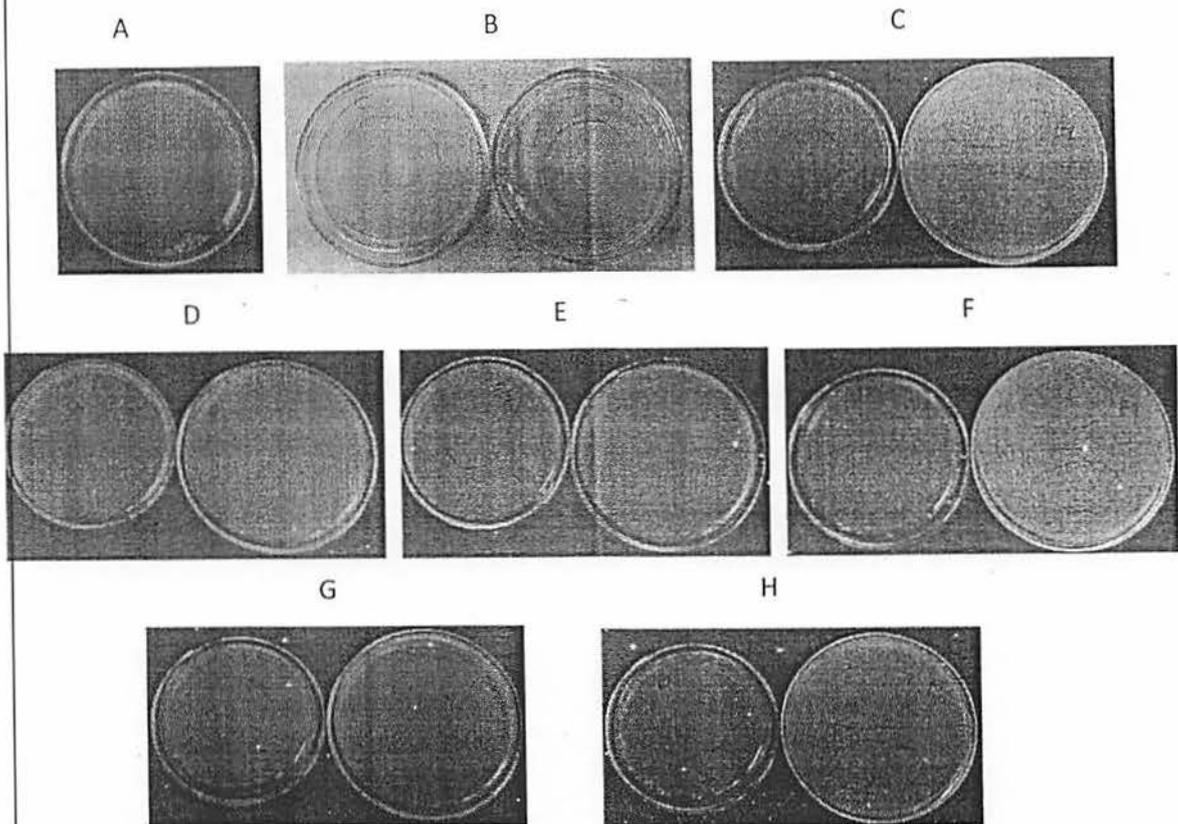
Keterangan:

(+) : Terdapat hambatan pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* H37RV ATCC 27294

(-) : Tidak terdapat hambatan pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* H37RV ATCC 27294

Kontrol (+) : Etambutol 10 µg/ml

Kontrol (-) : Campuran media dengan DMSO dan Tween 80



Gambar 5.7.h. Hasil Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) Fraksi *n*-Heksana terhadap *Mycobacterium tuberculosis* H37RV ATCC 27294

Keterangan:

Gambar A : Kontrol positif mengandung etambutol 10 µg/ml

Gambar B : Kontrol negatif mengandung campuran media dengan DMSO dan Tween 80

Gambar C : Fraksi E1 ekstrak *n*-heksana umbi bidara upas konsentrasi 400 µg/ml

Gambar D : Fraksi E2 ekstrak *n*-heksana umbi bidara upas konsentrasi 200 µg/ml

Gambar E : Fraksi E3 ekstrak *n*-heksana umbi bidara upas konsentrasi 100 µg/ml

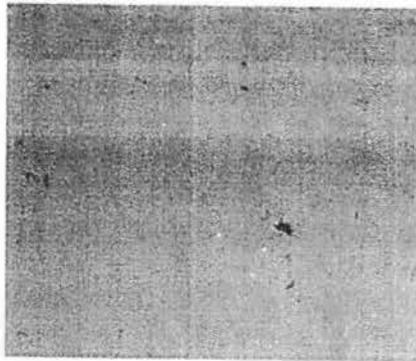
Gambar F : Fraksi E4 ekstrak *n*-heksana umbi bidara upas konsentrasi 50 µg/ml

Gambar G : Fraksi E5 ekstrak *n*-heksana umbi bidara upas konsentrasi 25 µg/ml

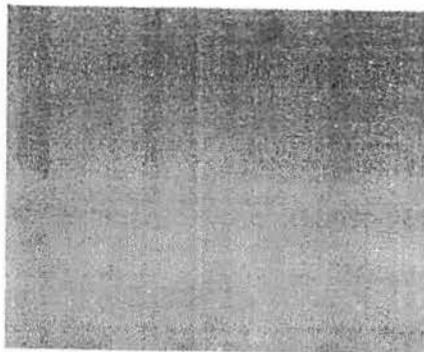
Gambar H : Fraksi E6 ekstrak *n*-heksana umbi bidara upas konsentrasi 12,5 µg/ml

5.6. Uji Identifikasi Standar Koloni Kuman *Mycobacterium tuberculosis* H37RV ATCC 27294 pada Fraksi *n*-heksana secara Mikroskopis

Uji identifikasi standar koloni kuman *Mycobacterium tuberculosis* H37RV ATCC 27294 dilakukan secara mikroskopis menggunakan mikroskop cahaya dengan pewarnaan Zielh-Nelseen. Pada pengujian awal aktivitas antimikroba diperoleh hasil positif dengan terbentuknya warna merah yang menandakan adanya Basil Tahan Asam (BTA) (Gambar 5.8.h.) pada fraksi B, C, D, dan F, hasil negatif dengan terbentuknya warna biru (Gambar 5.9.h.) pada fraksi E. Sedangkan pada penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM), semua konsentrasi larutan uji menunjukkan hasil pewarnaan negatif.



Gambar 5.8.h. Hasil mikroskopis terhadap media pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* H37RV ATCC 27294: (A) BTA positif menandakan adanya pertumbuhan (perbesaran 1000 kali)



Gambar 5.9.h. Hasil mikroskopis terhadap media pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* H37RV ATCC 27294: (B) BTA negatif menandakan tidak terdapatnya pertumbuhan (perbesaran 1000 kali)

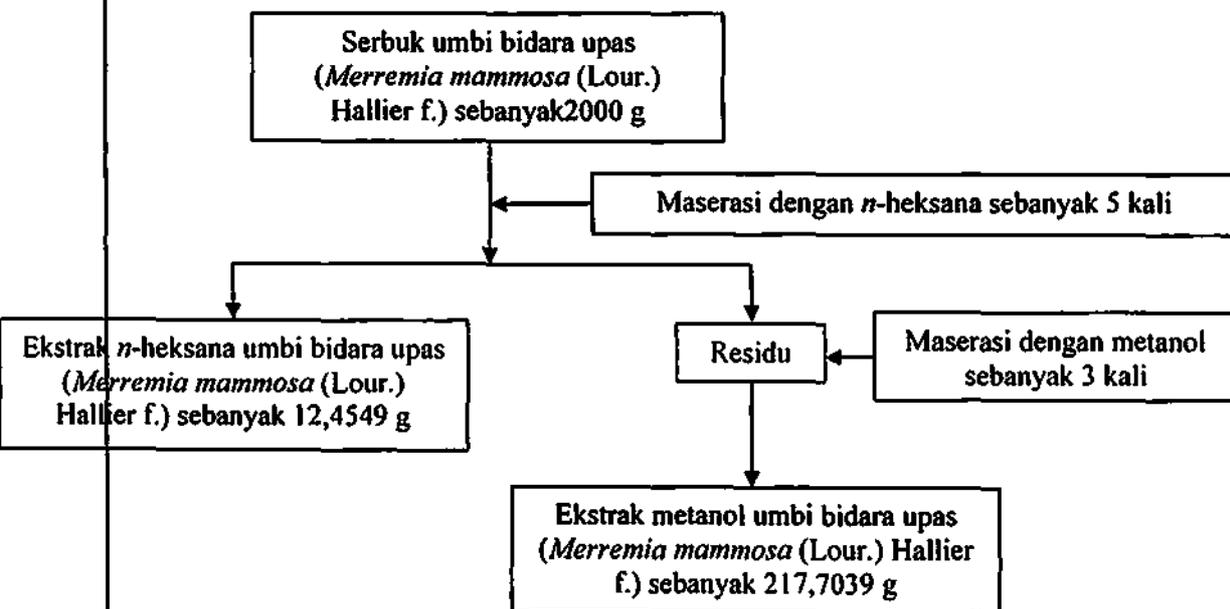
Fraksinasi dan Uji Aktivitas Anti Bakteri Fraksi Metanol

5.1 Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan adalah umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.) Hallier f.) yang diambil dari Sumenep, Madura pada bulan Agustus 2010. Berdasarkan hasil determinasi dari Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia UPT Balai Pengembangan Kebun Raya Cabang Balai Kebun Raya Purwodadi, Pasuruan, Jawa Timur menunjukkan tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.) Hallier f.).

5.2 Ekstraksi Umbi Bidara Upas (*Merremia mammosa* (Lour.) Hallier f.)

Hasil maserasi sebanyak lima kali dari 2000 g serbuk umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.) Hallier f.) dengan pelarut *n*-heksana berupa massa cair berwarna coklat. Setelah diuapkan dengan *vacuum rotary evaporator*, diperoleh ekstrak kental berwarna coklat sebanyak 12,4549 gram. Residu hasil maserasi dengan *n*-heksana, dimaserasi kembali dengan metanol sebanyak 3 kali. Setelah diuapkan dengan *vacuum rotary evaporator*, diperoleh ekstrak kental berwarna coklat muda sebanyak 217,7039 gram. Keterangan jumlah dan persentase serbuk dan ekstrak yang dihasilkan dapat dilihat pada gambar 5.1.m di bawah ini.



Gambar 5.1.m. Skema Hasil Pembuatan Ekstrak Umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.) Hallier f.)

Hasil eluasi ekstrak metanol umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.) Hallier f.) dengan eluen butanol : asam asetat : air (4:1:5) menunjukkan adanya noda yang berwarna kuning pada penampak noda uap ammonia dan ceri sulfat dengan Rf sebesar 0,38. Dapat dipastikan dalam ekstrak methanol umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.) Hallier f.) positif mengandung senyawa golongan flavonoid. Eluasi pemeriksaan ekstrak methanol terhadap flavonoid menggunakan fase diam silika gel GF₂₅₄ Merck dapat dilihat pada gambar 5.2 m dan nilai Rf tertera pada tabel V.1.m.



Gambar 5.2.m. Kromatogram hasil KLT ekstrak metanol umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.) Hallier f.) dengan eluen butanol : asam asetat : air (4:1:5), fase diam silika gel GF₂₅₄ Merck dengan penampak noda uap amonia

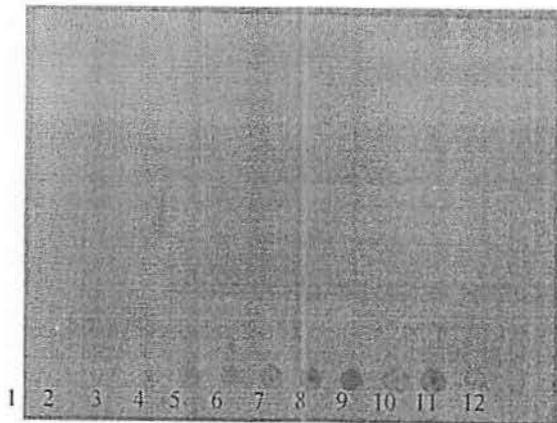
Tabel V.1.m. Hasil KLT skrining ekstrak metanol umbi bidara upas (*Merremia mammosa*, (Lour.) Hallier f.) terhadap senyawa golongan flavonoid.

No.	Nilai Rf	Warna Noda
1	0,78	Kuning
2	0,58	Kuning
3	0,32	Kuning

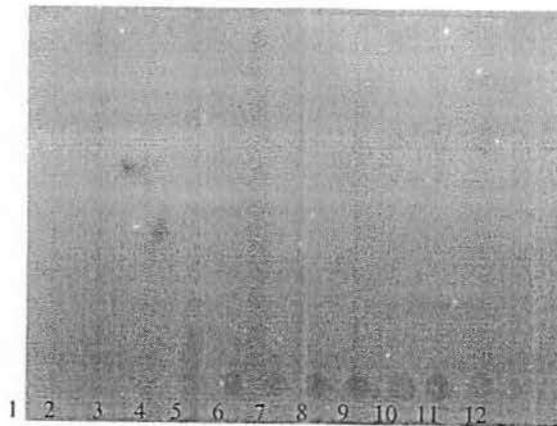
5.3 Fraksinasi Ekstrak Metanol Umbi Bidara Upas Dengan Kromatografi Cair Vakum (KCV)

Hasil fraksinasi 7 gram ekstrak metanol umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.) Hallier f.) menggunakan eluen kloroform-metanol secara gradient berdasarkan optimasi eluen, menghasilkan 12 fraksi. Kemudian fraksi-fraksi tersebut dilakukan KLT dengan fase diam silika gel 60 GF₂₅₄ Merck, fase gerak kloroform-metanol 9:1(v/v), serta

diberi penampak noda uap amonia dan ceri IV sulfat. Hasil KLT keseluruhan fraksi seperti yang terlihat pada gambar 5.3.m. (a) dan 5.3 .m.(b). Jumlah noda beserta harga Rf tertera pada tabel V.2. m. Kemudian dari semua fraksi tersebut hanya fraksi 2 sampai dengan fraksi 10 yang dilakukan pengujian aktivitas antibakteri.



(a)



(b)

Gambar 5.3.m. Hasil KLT 12 fraksi hasil kromatografi cair vakum dengan fase gerak kloroform-metanol 9:1 (v/v), fase diam silika gel 60 GF₂₅₄ Merck dengan penampak noda (a) uap amonia (b) ceri IV sulfat

Tabel V.2.m. Hasil KLT berbagai fraksi ekstrak metanol umbi bidara dengan eluen kloroform:metanol (9:1) %, dengan penampak noda uap ammonia dan cerisulfat

Fraksi No.	Berat (g)	Harga Rf	Warna Noda (UapAmonia)	Warna Noda (Ceri IV Sulfat)
1	0,0962	-	-	-
2	0,0681	0,64	Kuning	Kuning oranye
3	0,5559	0,45	Kuning	Kuning oranye
4	0,2238	0,16	Kuning	Kuning oranye
5	1,1972	-	-	-
6	1,8141	-	-	-
7	0,9186	-	-	-
8	0,5193	-	-	-
9	0,0278	-	-	-
10	0,4420	-	-	-
11	0,0643	-	-	-
12	0,0776	-	-	-

5.4 Uji Aktivitas Antibakteri

5.4.1 Pemilihan Fraksi Aktif Antibakteri

Hasil pengujian aktivitas antibakteri menggunakan fraksi ekstrak metanol umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.) Hallier f.) pada konsentrasi 500 µg/ml menunjukkan bahwa tidak semua fraksi menunjukkan hambatan pertumbuhan terhadap *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC 27294. Berdasarkan hasil pengujian, hanya fraksi 4 saja yang menunjukkan adanya hambatan pertumbuhan bakteri, secara visual ditandai dengan tidak adanya koloni kuman yang tumbuh seperti pada gambar 5.4. m. Sedangkan pada fraksi 2, fraksi3, fraksi 5 sampai dengan 10 secara visual tumbuh koloni kuman. Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi-fraksi ekstrak metanol umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.) Hallier f.) tersaji pada tabel V.3.m.

Tabel V.3.m. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Ekstrak Metanol Umbi Bidara Upas terhadap *Mycobacterium tuberculosis* H37RV ATCC 27294

Fraksi	Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Hasil	
		Replikasi 1	Replikasi 2
Fraksi 2	500	-	-
Fraksi 3	500	-	-
Fraksi 4	500	+	+
Fraksi 5	500	-	-
Fraksi 6	500	-	-
Fraksi 7	500	-	-
Fraksi 8	500	-	-
Fraksi 9	500	-	-
Fraksi 10	500	-	-
KontrolPositif	10	+	
KontrolNegatif	-	-	
KontrolVertilitas	-	-	

Keterangan :Tanda (+) : Ada hambatan pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis*

Tanda (-) : Tidak ada hambatan pertumbuhan

Kontrol positif : etambutol 10 $\mu\text{g/ml}$

Kontrol negatif : Media pertumbuhan bakteri dengan DMSO dan Tween 80

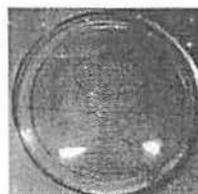
Kontrol vertilitas : Media pertumbuhan bakteri



1



2



3



4



5 LAPORAN PENELITIAN



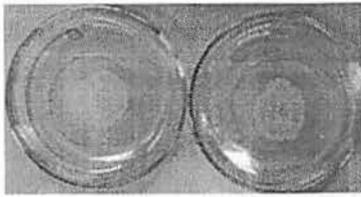
6



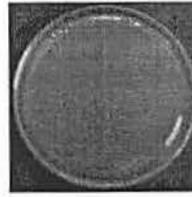
Fraksingsi dan Uji Daya...



8 Mangestuti Agil



Kontrol negatif



Kontrol positif

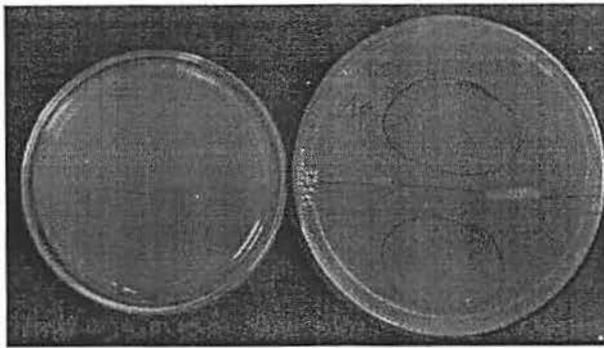
Gambar 5.4.m. Hasil Uji Aktivitas Antimikroba Fraksi metanol terhadap *Mycobacterium tuberculosis* H37RV ATCC 27294

Keterangan:

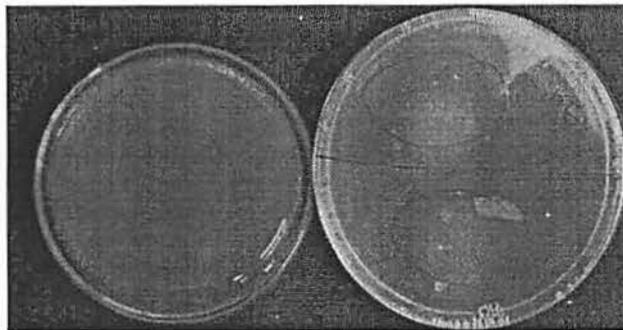
- Gambar 1 : Fraksi 2 ekstrak metanol umbi bidara upas konsentrasi 500 $\mu\text{g/ml}$
 Gambar 2 : Fraksi 3 ekstrak metanol umbi bidara upas konsentrasi 500 $\mu\text{g/ml}$
 Gambar 3 : Fraksi 4 ekstrak metanol umbi bidara upas konsentrasi 500 $\mu\text{g/ml}$
 Gambar 4 : Fraksi 5 ekstrak metanol umbi bidara upas konsentrasi 500 $\mu\text{g/ml}$
 Gambar 5 : Fraksi 6 ekstrak metanol umbi bidara upas konsentrasi 500 $\mu\text{g/ml}$
 Gambar 6 : Fraksi 7 ekstrak metanol umbi bidara upas konsentrasi 500 $\mu\text{g/ml}$
 Gambar 7 : Fraksi 8 ekstrak metanol umbi bidara upas konsentrasi 500 $\mu\text{g/ml}$
 Gambar 8 : Fraksi 9 ekstrak metanol umbi bidara upas konsentrasi 500 $\mu\text{g/ml}$

5.4.2 Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)

Penentuan KHM dilakukan pada fraksi 4 yang telah terbukti memiliki aktivitas antibakteri. Fraksi 4 ini dibuat menjadi beberapa konsentrasi (500, 400, 200, 100, 50, 25, dan 12,5 ppm). Kemudian larutan-larutan tersebut dicampur dengan media Middlebrook 7H9 dan bakteri *Mycobacterium tuberculosis* dan ditanamkan pada media Middlebrook 7H10. Berdasarkan hasil pengujian diketahui pada konsentrasi 25 dan 12,5 $\mu\text{g/ml}$ terdapat pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC 27295 seperti pada gambar 5.5.m. Pada konsentrasi lain tidak didapatkan adanya pertumbuhan kuman. Data hasil pengujian disajikan sebagai berikut pada tabel V.4.m.



(a)



(b)

Gambar 5.5.m. Hasil penentuan KHM pada Fraksi 4 dengan konsentrasi (a) 25 $\mu\text{g/ml}$ dan (b) 12,5 $\mu\text{g/ml}$

Tabel V.4.m. Hasil Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)

Nomor	Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Hasil		
		Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3
4a	500	+	+	+
4b	400	+	+	+
4c	200	+	+	+
4d	100	+	+	+
4e	50	+	+	+
4f	25	-	-	-
4g	12,5	-	-	-
KontrolPositif	10	+		
KontrolNegatif	-	-		
Kontrolvertilitas	-	-		

Keterangan :

- Tanda (+) : Ada hambatan pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis*
 Tanda (-) : Tidak ada hambatan pertumbuhan
 Kontrol positif : etambutol 10 µg/ml
 Kontrol negatif : Media pertumbuhan bakteri dengan DMSO dan Tween 80
 Kontrol vertilitas : Media pertumbuhan bakteri

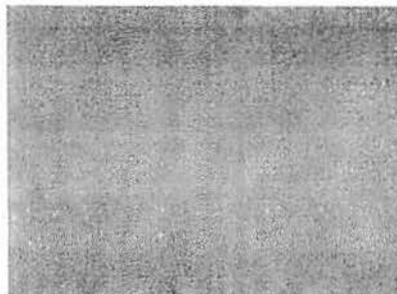
5.5 Uji Identifikasi Koloni *Mycobacterium tuberculosis*

5.5.1 Pemilihan Fraksi Aktif

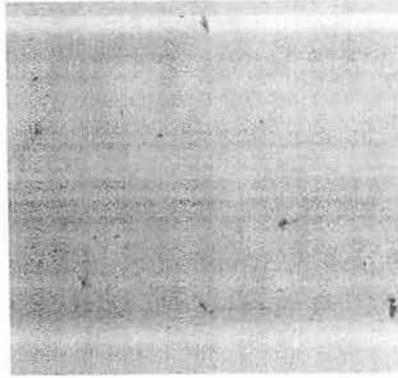
Hasil pengujian pada tahap pemilihan fraksi aktif dengan menggunakan fraksi 4 secara mikroskopis menunjukkan hasil positif dengan hanya muncul warna biru muda pada pewarnaan Zielh-Neelsen seperti pada gambar 5.6.m. Pada fraksi 2, fraksi 3, fraksi 5 sampai dengan 10 menunjukkan hasil yang negatif dengan munculnya Bakteri Tahan Asam yang berwarna merah muda pewarnaan Zielh-Neelsen seperti pada gambar 5.7.m.

5.5.2 Penentuan Konsentrasi Hambat Minimal

Hasil pengujian pada tahap penentuan konsentrasi hambat minimal dengan menggunakan fraksi 4 dengan konsentrasi 500, 400, 200, 100 dan 50µg/ml secara mikroskopis menunjukkan hasil positif dengan dengan hanya muncul warna biru muda pada pewarnaan Zielh-Neelsen seperti pada gambar 5.6. m.Sedangkan pada konsentrasi 25 dan 12,5µg/ml menunjukkan hasil yang negatif dengan munculnya Basil Tahan Asam yang berwarna merah muda pewarnaan Zielh-Neelsen seperti pada gambar 5.7.m.



Gambar 5.6.m. Hasil mikroskopis terhadap media pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 BTA negatif menandakan tidak terdapatnya pertumbuhan



Gambar 5.7.m. Hasil mikroskopis terhadap media pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 BTA positif menandakan adanya pertumbuhan

PEMBAHASAN

Fraksi ekstrak *n*-heksana

Hasil skrining fitokimia terpenoid dan triterpenoid yang dilakukan terhadap ekstrak *n*-heksana umbi bidara upas menggunakan KLT dengan fase gerak *n*-heksana : etil asetat (4:1) dan penampak noda anisaldehyd- H_2SO_4 menghasilkan 5 noda intensif berwarna merah ungu dengan Rf 0,76; 0,68; 0,53; 0,34 dan 0,23 yang menunjukkan adanya senyawa terpenoid. Sedangkan dengan penampak noda lain yaitu Liebermann-Burchard (gambar 5.2) menghasilkan 3 noda intensif dengan Rf 0,77; 0,64 dan 0,26 yang berpendar (merah muda) dibawah sinar UV 366 nm yang menunjukkan positif senyawa triterpenoid. Selain itu juga dilakukan uji Salkowski yang menunjukkan hasil negatif yang ditandai tidak terbentuknya cincin merah (steroid tak jenuh negatif)

Uji aktivitas antimikroba dilakukan dengan menggunakan 5 macam fraksi yaitu fraksi B, C, D, E, dan F. Digunakan 5 macam fraksi karena hasil KLT menunjukkan noda yang dominan. Noda yang dominan tersebut diharapkan mempunyai konsentrasi yang besar sehingga dapat memberikan aktivitas yang besar sebagai antimikroba. Fraksi A tidak digunakan untuk uji aktivitas karena tidak terdapat noda yang dominan pada hasil KLT sehingga kemungkinan tidak memberikan aktivitas antimikroba, selain itu fraksi A sifatnya non polar sehingga sulit untuk menembus membran sel bakteri. Setelah mendapatkan fraksi yang aktif sebagai antimikroba maka dilakukan penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) menggunakan larutan uji dengan berbagai konsentrasi.

Pada pengujian awal aktivitas antimikroba digunakan 5 fraksi dengan konsentrasi 400 $\mu\text{g/ml}$. Hal ini didasarkan harga Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ekstrak *n*-heksana umbi bidara upas yaitu sebesar 400 $\mu\text{g/ml}$ (Olevianingrum, 2010). Pada penentuan

Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) fraksi yang aktif terhadap *Mycobacterium tuberculosis* H37RV ATCC 27294 digunakan konsentrasi 400 – 12,5 µg/ml. Diharapkan penurunan konsentrasi fraksi terpilih tersebut masih mempunyai aktivitas antimikroba. Fraksi yang akan diuji ditambahkan DMSO dan Tween 80 sebanyak 2% dan 1%. Penambahan bahan tersebut dilakukan agar fraksi terdispersi dengan baik dalam air sehingga terbentuk suspensi yang lebih homogen.

Mikroba yang digunakan pada penelitian ini adalah *Mycobacterium tuberculosis* H37RV ATCC 27294 yang berasal dari isolat murni yang diperoleh dari Institute Tropical Disease (ITD) dan biasa digunakan dalam penelitian antituberkulosis. Mikroba ini sensitif terhadap etambutol. Inokulum mikroba uji yang digunakan dibandingkan dengan standart Mc Farland 0,5 kemudian diencerkan sampai diperoleh jumlah koloni kuman 10^5 CFU/ml. Pengenceran tersebut dilakukan karena apabila jumlah koloni kuman kurang dari 10^5 CFU/ml menyebabkan pertumbuhan mikroba tidak jelas, sedangkan apabila jumlah koloni kuman lebih dari 10^5 CFU/ml maka daya hambat fraksi tidak dapat dilihat dengan jelas karena terlalu banyak mikroba yang tumbuh.

Mycobacterium tuberculosis mempunyai dinding sel yang kaya akan lipid sehingga sulit ditembus fraksi yang didispersikan dalam air, oleh karena itu pada saat dicampur dengan media middlebrook 7H9 digunakan *glass beads* kemudian dikocok agar lebih homogen. Setelah dihomogenkan dengan media 7H9, campuran bakteri dan media middlebrook 7H9 tersebut diteteskan pada media padat 7H10 untuk mengetahui adanya pertumbuhan mikroba dan dapat diamati secara langsung.

Kontrol positif yang digunakan dalam penelitian ini adalah etambutol dengan konsentrasi 10 µg/ml. Etambutol merupakan obat lini pertama pada terapi penyakit tuberkulosis. Etambutol aktif secara bakteristatik yaitu menghambat pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis*. Mekanisme kerja etambutol adalah menghambat enzim arabinosyl transferase yang terlibat dalam reaksi polimerisasi arabinoglukan, sebuah komponen penting dari dinding sel mikobakteri. Kontrol negatif digunakan larutan air yang dicampur DMSO dan Tween 80 sesuai konsentrasi yang digunakan sebagai pelarut. Hal ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh larutan tersebut terhadap pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis*. Konsentrasi bahan yang terdapat dalam larutan tersebut adalah DMSO 2% dan Tween 80 1%.

Hasil pengujian awal terhadap fraksi B, C, D, E, dan F pada konsentrasi 400 µg/ml menunjukkan bahwa fraksi E ekstrak *n*-heksana umbi bidara upas mempunyai aktivitas terhadap mikroba uji *Mycobacterium tuberculosis* H37RV ATCC 27294. Hal ini

dapat dilihat adanya hambatan terhadap pertumbuhan mikroba uji. Fraksi E merupakan hasil pemisahan ekstrak *n*-heksana menggunakan metode Kromatografi Cair Vakum (KCV) dengan fase gerak *n*-heksana : etil asetat (60 : 40). Sedangkan fraksi B, C, D, dan F tidak mempunyai aktivitas antimikroba yang ditunjukkan dengan tumbuhnya mikroba uji. Fraksi yang aktif tersebut kemudian dilakukan penentuan harga Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dengan berbagai konsentrasi yaitu 400 – 12,5 µg/ml. Hasil pengujian tersebut menunjukkan bahwa pada semua konsentrasi larutan uji masih terdapat hambatan mikroba uji sehingga belum dapat ditentukan harga KHM. Diperlukan penelitian yang lebih lanjut untuk penentuan KHM fraksi E dengan melakukan pengenceran larutan uji sampai konsentrasi terkecil. Adanya hambatan pertumbuhan mikroba uji ditunjukkan oleh fakta secara visual tidak terdapat pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* H37RV ATCC 27294 dan secara mikroskopis dengan pewarnaan Zielh-neelsen dilakukan identifikasi bakteri tahan asam. Pada pewarnaan Zielh-neelsen, bakteri yang bersifat tahan asam akan mengikat warna pertama (carbol fuchsin 0,3%). Bakteri ini tidak luntur atau tahan terhadap peluntur warna (dekolorisasi) oleh asam dan alkohol. Pada saat penambahan warna kedua (*methylen blue* 0,3%), bakteri ini sudah tidak bisa mengikat warna tersebut. Dibawah mikroskop, bakteri tahan asam akan berwarna merah dengan dasar biru muda, sedangkan untuk bakteri yang lain tidak dapat mengikat warna pertama karena telah dilunturkan oleh asam dan alkohol sehingga akan mengikat warna kedua yaitu biru muda.

Pendekatan yang dapat digunakan untuk menjelaskan tentang aktivitas antimikroba yang dimiliki oleh fraksi E ekstrak *n*-heksana umbi bidara upas adalah kandungan terpenoid yang mempunyai aktivitas sebagai antimikroba. Mekanisme kerja senyawa terpenoid sebagai antimikroba belum sepenuhnya dipahami, namun diketahui menimbulkan gangguan membran sel bakteri dari sifat lipofilik yang dimilikinya. Adanya peningkatan hidrofilitas dari senyawa terpenoid akibat penambahan suatu gugus fungsi tertentu dapat menimbulkan penurunan aktivitas antimikroba.

Berdasarkan data empiris, air rebusan umbi bidara upas dapat digunakan sebagai obat anti tuberkulosis oleh masyarakat Madura. Hal ini diperkuat dengan data ilmiah yang menyebutkan bahwa ekstrak air dan *n*-heksana umbi bidara upas mempunyai aktivitas antimikroba terhadap *Mycobacterium tuberculosis* dengan harga KHM 400 µg/ml (Olevianingrum, 2010). Selain itu, fraksi ekstrak *n*-heksana umbi bidara upas juga memiliki aktivitas antimikroba. Dibutuhkan penelitian lebih lanjut untuk mengisolasi senyawa aktif yang berpotensi sebagai antimikroba sehingga dapat dikembangkan menjadi obat anti tuberkulosis yang memenuhi persyaratan aman, efektif dan aseptabel.

Fraksi metanol

Proses fraksinasi dilakukan dengan cara kromatografi cair vakum (KCV) dengan pelarut kloroform-metanol secara gradient. Fraksi-fraksi yang diperoleh dianalisa secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT) menggunakan pelarut kloroform-metanol 9:1 (v/v) dan menghasilkan noda kuning dengan penampak noda uap amonia dan ceri sulfat. Ternyata hanya fraksi 2, 3 dan 4 yang memberikan pemisahan baik, selain itu pada fraksi-fraksi tersebut menunjukkan positif flavonoid dengan adanya noda berwarna kuning pada penampak noda uap amonia dan kuning jingga dengan penampak noda ceri sulfat. Berdasarkan hasil fraksinasi, yang menunjukkan reaksi warna positif dengan penampak noda untuk flavonoid yaitu dengan uap amonia dan ceri sulfat adalah fraksi 2 – 10, dengan demikian diasumsikan fraksi-fraksi tersebut memiliki senyawa golongan flavonoid kemudian dilakukan uji aktivitas. Pada fraksi 1 tidak nampak adanya noda. Diasumsikan pada fraksi 1 tidak ada senyawa aktif sehingga tidak diujikan. Pada fraksi 11 dan 12 terdapat noda yang samar. Diasumsikan pada fraksi 11 dan 12 senyawa aktifnya sudah habis atau konsentrasinya sangat rendah, sehingga kedua fraksi tersebut juga tidak diujikan.

Bakteri uji yang digunakan adalah *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC 27294. Bakteri jenis ini digunakan karena bakteri ini masih sensitif terhadap obat lini pertama anti-TB dan juga yang biasa digunakan pada penelitian pendahuluan senyawa anti-TB. Inokulum bakteri uji ini kemudian distandarkan dengan McFarland 0,5 lalu diencerkan sampai jumlah koloni sebesar 10^5 CFU/ml. Apabila pengenceran lebih atau kurang dari 10^5 CFU/ml, akan menyebabkan koloni kuman tidak akan terlihat jelas atau bisa menyebabkan daya hambat fraksi menjadi berkurang.

Pada tahap pemilihan fraksi aktif, digunakan konsentrasi sebesar 500 µg/ml. Hal ini didasarkan pada penelitian terdahulu yang telah dilakukan oleh Olevianingrum (2010) yang mengatakan bahwa konsentrasi terkecil yang masih memberikan hambatan pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 dari ekstrak metanol umbibidaraupas (*Merremiamammosa* (Lour.) Hallier f.) adalah sebesar 500 µg/ml. Pemberian DMSO dan Tween dimaksudkan untuk membantu tercampurnya fraksi-fraksi tersebut dalam larutan.

Kontrol positif yang digunakan adalah etambutol. Etambutol merupakan bakteriostatik yang bekerja dengan cara menghambat pembentukan metabolit yang

diperlukan untuk proses replikasi sel. Kontrol negatif yang digunakan terdiri dari larutan Tween 80 dan DMSO pada kadar $\leq 2\%$ dan *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 tanpa ekstrak. Kontrol negatif digunakan untuk mengetahui pengaruh penggunaan Tween 80 dan DMSO terhadap pertumbuhan bakteri. Kontrol fertilitas menggunakan media Middlebrook 7H9 dan 7H10 dengan *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC 27294.

Hasil pengujian aktivitas antibakteri menunjukkan bahwa hanya satu dari 10 fraksi tersebut yang aktif menghambat pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis*, yaitu fraksi 4. Hal ini ditunjukkan secara visual tidak nampak adanya koloni kuman *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 pada media agar yang telah dicampur dengan fraksi 4 setelah diinkubasi selama 2 minggu. Pada media agar yang telah diberi fraksi 2, fraksi 3, fraksi 5 sampai dengan fraksi 10 secara visual muncul koloni kuman *Mycobacterium tuberculosis* setelah masa inkubasi 2 minggu. Secara mikroskopis kedua hal di atas bisa dibuktikan dengan cara pewarnaan Ziehl-Neelsen. Pewarnaan ini secara spesifik dapat mengidentifikasi adanya bakteri tahan asam. Adanya Bakteri Tahan Asam ditandai dengan munculnya warna merah muda dengan *background* berwarna biru muda. Pada fraksi 4 hanya terlihat *background* biru muda, sedangkan fraksi lain terlihat Basil Tahan Asam yang berwarna merah muda.

Pada fraksi ekstrak metanol umbi bidara upas diidentifikasi secara KLT bahwa fraksi tersebut mengandung senyawa golongan flavonoid. Flavonoid telah diketahui disintesis oleh tanaman sebagai respon terhadap infeksi dari mikroba, sehingga secara *in vitro* memiliki efek antibakteri (Cowan, 1999). Flavonoid juga telah terbukti aktif menghambat kerja salah satu enzim dari *Mycobacterium tuberculosis*. Mekanisme penghambatan pertumbuhan kuman *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 kemungkinan berasal dari kemampuan senyawa golongan flavonoid untuk membentuk kompleks pada membran sel, merusak membran sel, atau menginaktivasi protein pembentuk dinding sel. Dibutuhkan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui secara pasti bagaimana mekanisme penghambatan tersebut.

Pada fraksi 4 terbukti mengandung senyawa golongan flavonoid. Harga Rf fraksi 4 jauh berbeda dari fraksi-fraksi lainnya, sehingga dapat dikatakan fraksi 4 memiliki senyawa-senyawa yang berbeda dari fraksi lainnya. Senyawa-senyawa inilah yang aktif menghambat pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC 27294, walaupun pada fraksi 2 dan 3 juga mengandung senyawa golongan flavonoid, namun perbedaan struktur pada senyawa golongan flavonoid bisa menghasilkan aktivitas yang berbeda.

Berdasarkan literatur, perbedaan struktur sangat mempengaruhi aktivitas farmakologi pada fraksi atau ekstrak tanaman.

Penelitian yang dilakukan oleh Hostteimann (1999) mengatakan isolat senyawa aktif yang diperoleh dari suatu fraksi atau ekstrak memiliki aktivitas lebih tinggi daripada fraksi atau ekstrak itu karena konsentrasi isolat pada ekstrak umumnya sangat kecil. Hal ini yang membuat aktivitas senyawa aktif pada ekstrak tersebut menjadi lebih rendah. Hal yang sama kemungkinan terjadi pada fraksi-fraksi lainnya yang tidak menunjukkan aktivitas sehingga fraksi-fraksi tersebut tidak bisa memberikan hambatan pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC 27294. Pada fraksi 5 sampai dengan fraksi 10 tidak terjadi pemisahan yang baik, sehingga tidak diketahui dengan jelas apakah pada fraksi-fraksi tersebut juga mengandung flavonoid.

Hasil penentuan Konsentrasi Hambat Minimal (KHM) menunjukkan bahwa fraksi 4 ekstrak metanol umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.) Hallier f.) masih aktif menghambat pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* sampai pada konsentrasi 50 µg/ml. Hal ini menunjukkan bahwa fraksi dari ekstrak metanol umbi bidara upas memiliki aktivitas yang lebih baik daripada ekstrak metanol yang KHM-nya sebesar 500 µg/ml. Ada beberapa hal yang kemungkinan menyebabkan hal tersebut antara lain adanya senyawa lain pada ekstrak yang bersifat antagonis ataupun kompetitif dengan senyawa aktif yang terdapat dalam fraksi 4 tersebut. Mengkaji hal-hal di atas, maka perlu dilakukan pengujian aktivitas fraksi ekstrak metanol umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.) Hallier f.) secara *in vitro* dan dilakukan isolasi senyawa aktif.

Aktivitas antibakteri fraksi 4 ekstrak metanol umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.) Hallier f.) terhadap *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 membuktikan bahwa umbi bidara upas memang bisa digunakan sebagai pengobatan alternatif anti-TB. Nilai KHM fraksi 4 yang sebesar 50 µg/ml mengindikasikan potensi umbi bidara upas untuk dikembangkan menjadi suatu sediaan fitofarmaka.

BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN**KESIMPULAN**

1. Fraksi E ekstrak *n*-heksana umbi *Merremia mammosa* (Lour.) Hallier f. merupakan fraksi yang aktif terhadap *Mycobacterium tuberculosis* H37RV ATCC 27294
2. Fraksi E ekstrak *n*-heksana umbi *Merremia mammosa* (Lour.) Hallier f. pada konsentrasi 400-12,5 µg/ml masih mempunyai aktivitas terhadap *Mycobacterium tuberculosis* H37RV ATCC 27294, sehingga belum dapat ditentukan harga Konsentrasi Hambat Minimumnya.
3. Fraksi ke-4 ekstrak metanol umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.) Hallier f.) yang dapat menghambat pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC 27294.
4. Konsentrasi Hambat Minimum(KHM) fraksi 4 terhadap *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 sebesar 50 µg/ml.

SARAN

Melalui hasil penelitian ini, disarankan untuk melanjutkan penelitian untuk mengetahui mekanisme penghambatan ekstrak dan senyawa aktif terhadap bakteri TBC. Ini dikarenakan keunikan struktur dinding sel bakteri yang tidak mudah ditembus. Hasil penelitian diharapkan dapat memberi harapan diperolehnya obat alternative untuk memberantas penyakit TBC.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 1980. **Materia Medika Indonesia III**, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta. hal. 29-30
- Anonim, 1985. **Cara Pembuatan Simplisia**, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta, hal. 29-30
- Anonim, 1995. **Farmakope Indonesia IV**, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta, hal. 61-62
- Anonim, 2000. **Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat**. Cetakan pertama, Jakarta: Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, hal. 18-23, 26-29
- Anonim, 2002. **Pedoman Nasional Penanggulangan Tuberkulosis**, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, hal 1-13
- Anonim, 2004. **Penyakit Tuberkulosis**, Ditjen PPM dan Departemen Kesehatan Republik Indonesia <http://www.penyakitmenular.info/pm/detil.aspx=0&l=273>
- Backer, C.A. and Bakhuizen van den Brink, R.C., **Flora of Java**, vol.II, N.V.P. Noordhoff, Groningen, The Netherlands, 1965, p. 157-158.
- Bergne, D.A, Vanden, A.J, Vlietinck, **Screening Methods for Antibacterial and Antiviral Agent from Higher Plants In Methods in Plant Biochemistry**, Ed, K, Hostettmann, London, Hacourt Brace Jovanovich Publ., Vol. 6, 1998, pp, 46-47.
- Chairani, Eny, Moelyono, M.W., Supriyatna. **Penelusuran Senyawa Bioaktif Bidara Upas (*Merremia Mammosa*)**, **Cermin Dunia Farmasi**, Jurusan Farmasi fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Padjajaran, Sumedang, Jawa Barat, 1984, p. 26-29.
- Harborne, J.B. **Metode Fitokimia, Penuntun Cara Modern Menganalisa Tumbuhan**. Edisi II, ITB Bandung, 1987.
- Heftman, E. **Steroid, Chromatography, Fundamentals and Applications**. part B. Elsevier, Amsterdam, 1983, p. 191-222.
- Heming, W.H.M., Wirian, A.S., Yaputro, T., Dalimartina, S., Wibowo, B. **Tanaman Berkhasiat Obat Indonesia**. Cetakan 4, 1996, p. 92-93.
- Heyne, K. **Tanaman Berguna Indonesia III**, Jakarta: Yayasan Sarana Wana Jaya, 1987, p.1655-1656.
- Hostettmann, K., Hostettmann, M., Marston, A. **Cara Kromatografi Preparatif (Penggunaan pada isolasi senyawa alam)**, Bandung: Penerbit ITB, 1995, p. 86-87.
- Ismiati, E. **Isolasi Senyawa Aktif Antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dari Umbi *Merremia mammosa* Hall**. Skripsi. Universitas Airlangga, Surabaya, 1999.
- Jawetz, E., Melnick, J.L., and Adelberg, E.A, brooks, G.F., Butel, J.S., and Ornston. **Medical Microbiology**, 19th Edition, Prectice Hall International Inc., London, 1991, p.272.
- Kitagawa, I., Ohashi, K., Baek, N.I., sakagami, M., Yoshikawa, M., dan Shibuya, H. **Indonesian Medicinal Plants XIX. Chemical Structures of Four Additional Resin-Glycosides, Mammosides A, B, H1, and H2, from the Tuber of *Merremia mammosa* (Convolvulaceae)**. **Chem. Pharm. Bull** 45(5): 1997, p.786 - 794.

- Kriselina, A. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Heksana dan Metanol dari Umbi Bidara Upas (*Merremia mammosa* Hall). **Skripsi**. Surabaya: Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, 1997.
- Mangestuti A, Noor E, Retno W, Neny P. Uji daya hambat *Mycobacterium tuberculosis* dari umbi bidara upas (*Merremia mammosa* Hall). **Laporan akhir Stranas-DP2M Dikti**, 2010
- Mansyur, 2001. **Masalah Tuberkulosis Paru dan Penanggulangannya**, Universitas Indonesia, Jakarta
- Mardisworo, S., Radjakmangunsudarso, H. Cabe Puyang Warisan Nenek Moyang. Jilid 1, Cetakan kedua. Jakarta: PT Karya Wreda, 1968, p. 17-18
- Mulja, Muhammad and Suharman. **Analisis Instrumental**, Surabaya: Airlangga University Press, 1995, p. 237-251.
- Paxton, JD, **Assay for Antifungal Activity, Methods in Plant Biochemistry**, Vol, 6, London, Hacourt Brace Jovanovich Publ., 1991, pp, 33-36.
- Rios.J.L, Recio M.C, and Villar, A. Screening Methode for Nature Product with Antimicrobial Activity: A Review of Literature, **Journal of Etnopharmacology**, 23, 1988, p. 127-149.
- Sastrapradja S, **Umbi-umbian**, Lembaga Biologi Nasional, Balai Pustaka, Bogor, Juni 1977, Hal. 18-19.
- Sulistia G. **Farmakologi dan Terapi**, edisi 4, Jakarta, Gaya Baru , 1995, hal. 602.
- Tjetrosoepomo, Gembong. **Taksonomi Tumbuhan (Spermatophyta)**. Yogyakarta: Gadjadara University Press, 1991, p. 354-356.
- Touchstone, Joseph C. **Practice of Thin Layer Chromatography**, Second edition, New York: Wiley Interscience Publication. 1983, p.313
- Widowati, Lucie, Dzulkarnain, B. Sa'roni. Tanaman Obat untuk Diabetes Mellitus. **Cermin Dunia Kedokteran**. No. 116, 1997, p. 53-60.
- Zulkarnain, **Analisis Drug Resistance Dan Multi Drug Resistance**, Universitas Sumatera Utara, 2004.