

**SINTESIS DAN UJI AKTIVITAS NANOEMULSI EKSTRAK
ETANOL LENGKUAS MERAH (*Alpinia purpurata* (Vieill) K.
Schum) SEBAGAI ANTIBAKTERI *Klebsiella pneumoniae***

SKRIPSI

**Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai
gelar Sarjana Sains (S.Si.) Program Studi Kimia pada
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Islam Indonesia
Yogyakarta**



diajukan oleh:

NURUL NINGTYAS INDRIANI

No Mhs : 16612030

**PROGRAM STUDI KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
YOGYAKARTA**

2020

**SINTESIS DAN UJI AKTIVITAS NANOEMULSI EKSTRAK
ETANOL LENGKUAS MERAH (*Alpinia purpurata* (Vieill) K.
Schum) SEBAGAI ANTIBAKTERI *Klebsiella pneumonia***

Oleh :

NURUL NINGTYAS INDRIANI

No. Mahasiswa : 16612030

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Skripsi Program Studi Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Islam Indonesia

Tanggal : 19 Januari 2021

Dewan Penguji

1. Amri Setyawati, S.Si., M.Sc.
2. Mai Anugrahwati, S.Si., M.Sc.
3. Dr. Habibi Hidayat, M.Si.
4. Dr. Tatang Shabur Julianto, M.Si.

Tanda Tangan

1. 
2. 
3. 
4. 

Mengetahui,

Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Islam Indonesia



(Prof. Riyanto, S.Pd., M.Si., Ph.D.)

LEMBAR PERNYATAAN KEASLIAN

HASIL TUGAS AKHIR

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Nurul Ningtyas Indriani

Nim : 16612030

Menyatakan seluruh komponen dan isi laporan dalam tugas akhir ini adalah hasil karya sendiri. Apabila dikemudian hari terbukti ada beberapa bagian dari karya ini bukan hasil sendiri, maka saya siap menanggung resiko dan konsekuensinya.

Yogyakarta, 19 Januari 2021



Nurul Ningtyas Indriani

KATA PENGANTAR



Assalamu'alaikum Warahmatullahi Wabarakaatuh

Puji syukur kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan berkah dan rahmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Laporan Tugas Akhir yang berjudul “Sintesis dan Uji Aktivitas Nanoemulsi Ekstrak Etanol Lengkuas Merah (*Alpinia purpurata* (Vieill) K. Schum) sebagai Antibakteri *Klebsiella pneumonia*” sebagai salah satu syarat memperoleh gelar Sarjana Sains (S.Si) di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta.

Keberhasilan penyusunan laporan tugas akhir ini sangat dipengaruhi oleh berbagai pihak. Pada kesempatan ini, penulis menyampaikan terimakasih kepada berbagai pihak yang telah memberikan kontribusi positif dalam pembuatan laporan ini. Dengan penuh rasa syukur penulis mengucapkan terimakasih kepada:

1. Bapak Fathul Wahid, S.T., M.Sc., Ph.D. selaku Rektor Universitas Islam Indonesia.
2. Bapak Prof. Riyanto, S.Pd., M.Si., Ph.D. selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia.
3. Bapak Dr. Dwiwarso Rubiyanto, S.Si., M.Si. selaku Ketua Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia.
4. Ibu Amri Setyawati, S.Si., M.Sc. selaku Dosen Pembimbing I yang telah meluangkan waktunya untuk membantu, mengarahkan serta memberikan dukungan moral kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi.
5. Ibu Mai Anugrahwati, S.Si., M.Sc. selaku Dosen Pembimbing II yang telah sabar membantu, mengarahkan serta memberikan dukungan moral kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi.
6. Seluruh dosen program studi Kimia yang telah sabar mendidik dan memberikan ilmu pengetahuan.

7. Bapak, mama, mba iwik, kakak, dan adik serta keluarga besar yang senantiasa memberikan dukungan doa, materi, dan kasih sayang yang tiada putusnya.
8. Bapak afifuedin, mba isna dan mas tohari, selaku Laboran Mikrobiologi FK dan Kimia UII yang telah membantu penulis selama penelitian.
9. Niken Caesanda R, Hilda Fitria, Rona Prima L, Aulia Asyura Z, Yulinar Agustin, Nadha Yuliningtyas, dan teman-teman kimia seperjuangan yang terus memberikan semangat yang tidak pernah putusnya bagi penulis.
10. Serta pihak-pihak lainnya yang tidak bias disebutkan satu persatu yang telah banyak membantu dalam pembuatan skripsi ini.

Semoga Allah SWT senantiasa memberikan bimbingan dan petunjuk kepada Bapak/Ibu/ Saudara sekalian. Penyusun menyadari bahwa Skripsi ini masih jauh dari sempurna, karena keterbatasannya pengetahuan dan kemampuan penyusun. Oleh karena itu, kritik dan saran dari semua pihak sangat diharapkan semi terciptanya kesempurnaan. Semoga laporan skripsi ini dapat bermanfaat bagi penulis, institusi pendidikan, dan masyarakat luas. Amiin.

Wassalamu'alaikum Warahmatullah Wabarakaatuh

Yogyakarta, 19 Januari 2021

Penulis

Nurul Ningtyas Indriani

SINTESIS DAN UJI AKTIVITAS NANOEMULSI EKSTRAK ETANOL LENGKUAS MERAH (*Alpinia purpurata* (Vieill) K. Schum) SEBAGAI ANTIBAKTERI *Klebsiella pneumoniae*

INTISARI

Nurul Ningtyas Indriani

16612030

Lengkuas merah (*Alpinia purpurata*) merupakan salah satu tanaman herbal yang berpotensi dalam bidang pengobatan. Salah satu manfaatnya adalah sebagai antibakteri. *Klebsiella pneumoniae* merupakan bakteri gram negatif penyebab penyakit infeksi pernapasan. Bakteri *Klebsiella pneumoniae* resisten terhadap beberapa antibiotik yang memiliki cincin beta-laktam seperti moropenem, kloramfenicol, ampicilin, dan siprofloksasin yang mendorong pencarian obat baru dari bahan alam sebagai alternatif. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk membuat formulasi nano dan mengetahui aktivitas nanoemulsi ekstrak lengkuas merah sebagai antibakteri *Klebsiella pneumoniae*. Penelitian ini diawali dengan melakukan variasi waktu maserasi selama 3, 6, 12, 18, 24, dan 30 jam serta perbandingan volume pelarut 400, 500, 600, 700, 800, dan 900 mL untuk mendapatkan rendemen optimum, diikuti dengan identifikasi senyawa aktif yang terdapat dalam ekstrak etanol lengkuas merah, uji kuantitatif kadar tannin, sintesis dan karakterisasi nanoemulsi, uji stabilitas nanoemulsi, dan uji aktivitas nanoemulsi ekstrak lengkuas merah sebagai antibakteri *Klebsiella pneumoniae*.

Hasil penelitian menunjukkan rendemen optimum sebesar 3,307% pada waktu ekstraksi 30 jam dan 3,205% untuk perbandingan simplisia dan pelarut (1:6) ($P < 0,05$). Hasil identifikasi senyawa menunjukkan ekstrak lengkuas merah memiliki senyawa metabolit sekunder alkaloid, tannin, dan steroid. Hasil uji kuantitatif kadar tannin menunjukkan kadar tannin dalam ekstrak sebesar 29,7262 ppm. Sintesis nanoemulsi ekstrak lengkuas merah menggunakan metode gelasi ionik dan rasio 5:1:1 antara surfaktan kitosan 0,1%, ko-surfaktan natrium tripolifosfat 0,1%, dan ekstrak lengkuas merah 12,5%. Hasil karakterisasi PSA menunjukkan nanoemulsi CS/TPP/Ekstrak dan CS/Ekstrak membentuk nano dengan ukuran 320,2 nm dan 412 nm, serta memiliki distribusi monodisper. Nanoemulsi CS/TPP/Ekstrak memiliki ukuran yang lebih kecil dari nanoemulsi CS/Ekstrak. Nanoemulsi CS/TPP/Ekstrak dan CS/Ekstrak memiliki stabilitas yang baik selama penyimpanan 4 minggu dengan pH 4 dan keadaan homogen. Nanoemulsi CS/TPP/Ekstrak dan CS/Ekstrak mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Klebsiella pneumoniae* dengan diameter hambat sebesar 9,1 mm dan 9,5 mm yang termasuk dalam penghambatan sedang.

Kata Kunci: Lengkuas merah, ekstraksi, nanoemulsi, antibakteri.

SYNTHESIS AND ACTIVITY TEST OF RED GALANGAL ETHANOL EXTRACT (*Alpinia purpurata* (Vieill) K. Schum) AS AN ANTIBACTERIAL *Klebsiella pneumoniae*

ABSTRACT

Nurul Ningtyas Indriani

16612030

Red galangal (*Alpinia purpurata*) is one of the potential herbs in the field of medicine. One of the benefits of red galangal as an antibacterial. *Klebsiella pneumoniae* is a gram negative bacteria that causes respiratory infectious diseases. *Klebsiella pneumoniae* are resistant to several antibiotics that have a beta-lactam ring such as meropenem, chloramphenicol, ampicillin, and ciprofloxacin which encourages the search for new drugs from natural ingredients as an alternatives. The aims of this study was to make a nanoformulation and determine the nanoemulsion activity of red galangal extract as an antibacterial *Klebsiella pneumoniae*. This research was initiated by varying the maceration time for 3, 6, 12, 18, 24, and 30 hours and the ratio of solvent volume of 400, 500, 600, 700, 800, and 900 mL to obtain optimum yield, followed the identification of the active compounds which contained in ethanol extract of red galangal, quantitative test of tannin content, synthesis and characterization of nanoemulsion, stability test of nanoemulsion, and activity test of nanoemulsion of red galangal extract as antibacterial *Klebsiella pneumoniae*.

The results showed that the optimum yield was 3.307% at the extraction time of 30 hours and 3.205% for the ratio of simplicia and solvent (1: 6) ($P < 0.05$). The results of the compound identification showed that red galangal extract had secondary metabolites of alkaloids, tannins and steroids. The quantitative test results of tannin content showed that tannin content in the extract was equal to 29.7262 ppm. Synthesis nanoemulsion of red galangal extract used the ionic gelation method and the ratio of 5: 1: 1 between 0.1% chitosan surfactant, 0.1% sodium tripolyphosphate co-surfactant, and 12.5% red galangal extract. The results of PSA characterization showed that CS / TPP / Extract and CS / Extract nanoemulsions formed nano with a size of 320.2 nm and 412 nm, and had a monodisper distribution. CS / TPP / Extract nanoemulsion has smaller size than CS / Extract nanoemulsion. Nanoemulsion CS / TPP / Extract and CS / Extract have good stability during 4 weeks storage with a pH of 4 and a homogeneous state. Nanoemulsion CS / TPP / Extract and CS / Extract were able to inhibit the growth of *Klebsiella pneumoniae* bacteria with an inhibitory diameter of 9.1 mm and 9.5 mm which were included in moderate inhibition.

Keyword: Red galangal, extraction, nanoemulsion, antibacterial.

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN TUGAS AKHIR	iii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iv
KATA PENGANTAR	v
INTISARI.....	vi
ABSTRACT.....	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.4 Manfaat Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 Bakteri <i>Klebsiella pneumoniae</i>	6
2.2 Senyawa Aktif Antibakteri dalam Lengkuas Merah (<i>Alpinia purpurata</i> <i>K.Schum</i>).....	6
2.3 Nanoemulsi	8
BAB II DASAR TEORI.....	10
3.1 Tanaman Lengkuas Merah (<i>Alpinia Purpurata</i>).....	10
3.1.1 Klasifikasi tanaman lengkuas merah (<i>Alpinia purpurata</i>).....	10
3.1.2 Kandungan dan manfaat tanaman lengkuas merah	11
3.2 Metode Ekstraksi	11
3.3 Senyawa Metabolit Sekunder	14
3.3.1 Flavonoid	15
3.3.2 Alkaloid.....	15
3.3.3 Saponin.....	16
3.3.4 Tannin	17
3.4 Nanoemulsi	17
3.5 Material Pembawa	19
3.5.1 Kitosan	19
3.5.2 Natrium Tripolifosfat	21
3.6 Ultrasonikasi	21
3.7 Karakterisasi Nanoemulsi	22
3.7.1 <i>Particle Size Analyzer</i>	23
3.7.2 Spektrofotometer Uv-Vis	24
3.8 Bakteri <i>Klebsiella pneumonia</i>	26

3.8.1 Uji Antibakteri	28
3.8.2 Antinotik	29
3.9 Inhalasi	31
BAB IV METODE PENELITIAN	33
4.1 Alat dan Bahan	33
4.2 Sampel dan Teknik Pengambilan	33
4.3 Cara Kerja Penelitian	33
4.3.1 Determinasi tanaman	33
4.3.2 Pembuatan simplisia	33
4.3.3 Ekstraksi lengkuas merah	34
4.3.4 Sintesis nanoemulsi ekstrak lengkuas merah	34
4.3.5 Karakterisasi nanoemulsi	35
4.3.6 Uji stabilitas nanoemulsi ekstrak lengkuas merah	35
4.3.7 Uji antibakteri nanoemulsi ekstrak lengkuas merah	35
4.3.8 Screening fitokimia	36
4.3.9 Uji kuantitatif kadar tannin ekstrak lengkuas merah	37
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN	39
5.1 Determinasi Tanaman	39
5.2 Pembuatan Simplisia	39
5.3 Ekstraksi Lengkuas Merah	40
5.3.1 Pengaruh variasi waktu kontak terhadap rendemen maserasi	40
5.3.2 Pengaruh variasi volume pelarut terhadap rendemen maserasi	42
5.4 Sintesis Nanoemulsi Ekstrak Lengkuas Merah	44
5.5 Karakterisasi Nanoemulsi	48
5.6 Uji Stabilitas Nanoemulsi ekstrak lengkuas merah	50
5.7 Uji Aktivitas Antibakteri nanoemulsi ekstrak lengkuas merah	52
5.8 Skrining Fitokimia	57
5.8.1 Mekanisme Antibakteri	60
5.9 Uji Kuantitatif Kadar tannin	62
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	65
6.1 Kesimpulan	65
6.2 Saran	65
DAFTAR PUSTAKA	67

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Tanaman lengkuas merah	10
Gambar 2. Alat ekstraksi soxhlet	13
Gambar 3. Distilasi sederhana dan distilasi fraksinasi	14
Gambar 4. Reaksi pembentukan kitosan dari kitin	20
Gambar 5. Natrium tripolifosfat	21
Gambar 6. Skema DLS untuk mendeteksi hamburan balik	23
Gambar 7. Bagian alat spektrofotometer UV-Vis	25
Gambar 8. Morfologi bakteri <i>Klebsiella pneumonia</i>	26
Gambar 9. Penyusun dinding sel bakteri <i>Klebsiella pneumonia</i>	27
Gambar 10. Grafik hubungan rendemen dengan waktu maserasi	41
Gambar 11. Grafik hubungan rendemen dengan volume pelarut	43
Gambar 12. Reaksi Protonisasi Kitosan.....	47
Gambar 13. Proses pembuatan dan ilustrasi nanoemulsi CS/TPP	48
Gambar 14. Reaksi alkaloid dengan pereaksi Dragendroff	58
Gambar 15. Reaksi nerolidol dengan pereaksi Libermann-Burchard	59
Gambar 16. Reaksi tannin dengan FeCl_3	60
Gambar 17. Interaksi kitosan sebagai material pembawa senyawa antibakteri.....	61
Gambar 18. Kurva standar asam tanat	63

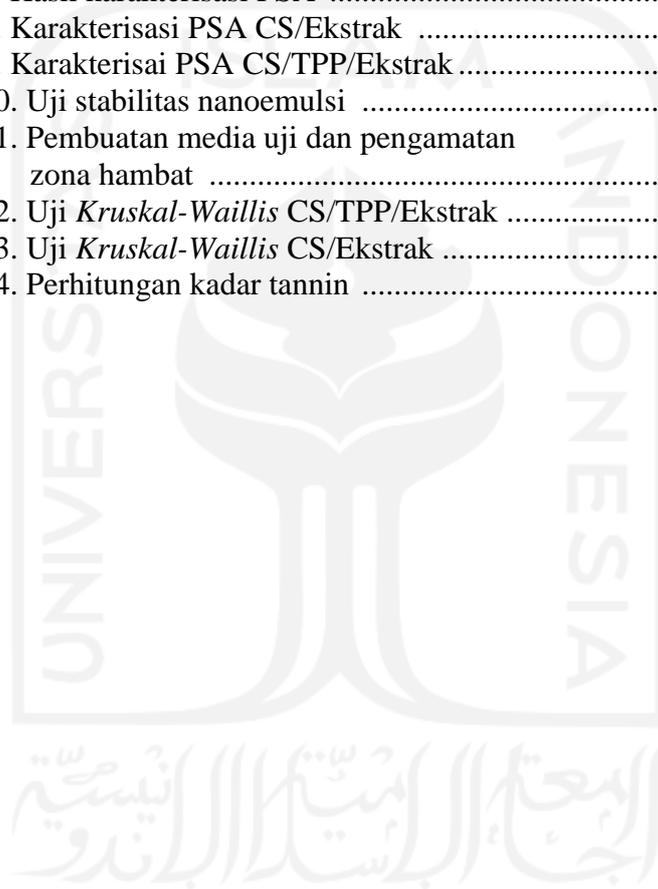
DAFTAR TABEL

Tabel 1. Karakterisasi nanoemulsi	49
Tabel 2. Uji stabilitas nanoemulsi pada suhu ruang	50
Tabel 3. Uji stabilitas nanoemulsi pada suhu 6 °C	51
Tabel 4. Diameter zona hambat nanoemulsi Chi/TPP/Ekstrak	54
Table 5. Diameter zona hambat nanoemulsi Chi/Ekstrak	54
Table 6. Skrining fitokimia ekstrak lengkuas merah	57
Tabel 7. Hasil uji kuantitatif kadar tannin	63



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Dokumentasi penelitian	79
Lampiran 2. Hasil determinasi tanaman.....	82
Lampiran 3. Perhitungan % rendemen maserasi variasi waktu	83
Lampiran 4. Perhitungan % rendemen maserasi variasi volume pelarut	86
Lampiran 5. Uji statistika ANOVA variasi waktu	89
Lampiran 6. Uji statistika ANOVA variasi volume pelarut	91
Lampiran 7. Hasil karakterisasi PSA	93
Lampiran 8. Karakterisasi PSA CS/Ekstrak	94
Lampiran 9. Karakterisasi PSA CS/TPP/Ekstrak	95
Lampiran 10. Uji stabilitas nanoemulsi	96
Lampiran 11. Pembuatan media uji dan pengamatan zona hambat	97
Lampiran 12. Uji <i>Kruskal-Wallis</i> CS/TPP/Ekstrak	99
Lampiran 13. Uji <i>Kruskal-Wallis</i> CS/Ekstrak	100
Lampiran 14. Perhitungan kadar tannin	101



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit infeksi merupakan penyakit yang dapat disebabkan oleh bakteri, virus, atau jamur. Salah satu penyakit infeksi yang umum diderita oleh manusia adalah infeksi saluran pernapasan yang disebabkan karena pola hidup yang buruk atau agen infeksius. Berdasarkan daerah infeksi, infeksi saluran pernapasan dibagi menjadi infeksi saluran pernapasan atas dan infeksi saluran pernapasan bawah. Gejala yang timbul karena adanya infeksi pada pernapasan meliputi demam, batuk, nyeri tenggorokan dan kesulitan bernapas (WHO., 2007). Berdasarkan data Riskesdas (Riset Kesehatan Dasar) pada tahun 2013 angka kasus kejadian ISPA di Indonesia sebesar 13,8% dengan kasus tertinggi terjadi di Aceh, Nusa Tenggara Timur, Papua, Jawa Tengah (Pujiani dan Arum, 2017).

Bakteri penyebab infeksi dalam saluran pernapasan antara lain *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan lain-lain (Agustina, dkk., 2019). Bakteri *Klebsiella pneumoniae* adalah bakteri gram negatif yang biasanya terdapat dalam feses, darah dan saluran pernapasan sebanyak 5% pada orang normal. Bakteri ini menyebabkan infeksi pada pernapasan, penyakit bronkitis, dan penyakit pneumonia (Tarina, 2017). Pengobatan klinis untuk menangani penyakit infeksi yaitu dengan antibiotik. Penggunaan antibiotik sebagai antimikroba dapat menyebabkan resistensi. Tingginya angka resistensi menimbulkan permasalahan baru yaitu kematian yang dilaporkan mencapai 700.000 kasus pertahun pada tahun 2014. Resistensi antibiotik ini dapat disebabkan oleh pemakaian antibiotik yang kurang teratur, dan dosis yang kurang tepat (Agustina, dkk., 2019).

Klebsiella pneumoniae merupakan bakteri patogen *Multidrug Resistance* (MDR). MDR *Klebsiella pneumoniae* merupakan resistensi bakteri terhadap minimal satu dari tiga lebih dari golongan antibiotik (Khasanah, dkk., 2019). Dilaporkan Lubis, dkk., (2016) *Klebsiella pneumoniae* mengalami resisten terhadap ceftriaxone sebesar 66,67%, diikuti ciprofloxacin 44,44% dan amoxicillin

clavulanate acid 33,33%. Selain itu penelitian Apondi, dkk., (2016) menyatakan bahwa sebagian besar *Klebsiella pneumoniae* MDR resisten terhadap 80% pada antibiotik penisilin, sefalosporin, tetrasiklin, kloramfenikol, sulfonamide. Dilaporkan oleh Baharutan, dkk., (2015) kepekaan bakteri *Klebsiella pneumonia* terhadap antibiotik eritromisin menunjukkan penghambatan yang intermediet sebesar 62,5%. Sedangkan *Klebsiella pneumonia* resisten terhadap antibiotik setriakson, seftazidim, dan trimetoprim/sulfametoksazol masing-masing sebesar 100%.

Resistensi bakteri *Klebsiella pneumoniae* terhadap beberapa antibiotik mendorong pencarian obat baru dari bahan alam sebagai alternatif. Penggunaan bahan alam sebagai obat tradisional semakin meningkat, karena dinilai lebih mudah didapat, ekonomis, dan memiliki efek samping yang relatif rendah. Salah satu bahan alam yang dapat digunakan sebagai obat adalah lengkuas merah (*Alpinia purpurata* (Vieill) K. Schum). Dilaporkan oleh Rahmat., (20017); Kusriani dan Shofia., (2015) lengkuas merah memiliki kandungan 1% minyak atsiri berwarna kuning kehijauan yang terdiri dari metil-sinamat 48%, sineol 20% - 30%, kamfer 1%, seskuioterpen, eugenol. Selain itu lengkuas merah memiliki kandungan senyawa tannin, flavonoid, kuinon, dan steroid/terpenoid.

Lengkuas merah dalam pengobatan herbal dimanfaatkan dalam bentuk infusa. Metode yang banyak digunakan dalam ekstraksi senyawa aktif dalam rimpang lengkuas merah adalah maserasi. Maserasi merupakan proses ekstraksi dengan teknik perendaman simplisia dengan pelarut yang sesuai. Maserasi memiliki kelebihan yaitu prosesnya sederhana, dan tidak menggunakan pemanasan sehingga, kemungkinan bahan dan senyawa aktif rusak atau terurai dapat diminimalkan. Faktor yang mempengaruhi hasil maserasi yaitu jenis pelarut, waktu ekstraksi, rasio berat bahan dengan volume pelarut, suhu, pengadukan, dan ukuran sampel. Koireowa (2012) menjelaskan waktu kontak yang semakin lama menyebabkan semakin banyak senyawa aktif yang dapat terekstrak. Hal ini disebabkan karena semakin lama waktu ekstraksi membuat kontak antara pelarut dengan bahan menjadi semakin lama yang menyebabkan kemampuan pelarut untuk menarik senyawa aktif semakin optimal. Yulianingtyas, dkk., (2016) menjelaskan

bahwa volume pelarut dapat menambah difusifitas pelarut kedalam sel simplisia dan meningkatkan desorpsi senyawa aktif dalam sel. Kemudian Damanik (2014) menjelaskan pemilihan pelarut adalah faktor penting dalam proses ekstraksi. Pelarut yang digunakan harus mampu menarik senyawa aktif, mudah dipisahkan dan dimurnikan kembali. Puasa, dkk., (2019) melaporkan hasil maserasi rimpang lengkuas merah dengan rasio 1:5 menggunakan pelarut etanol 96% selama 5 hari mendapatkan ekstrak kental sebanyak 7,7 g dan rendemen 5,13%. Alta, dkk., (2019) melaporkan ekstraksi lengkuas merah dengan etanol 70% dan rasio 1:10 selama 24 jam menghasilkan ekstrak kental dengan rendemen 16,04%. Lusiani (2018) melaporkan maserasi rimpang lengkuas merah dengan perbandingan 1:5 selama 3 hari mendapatkan ekstrak kental 21 g dan rendemen sebesar 5,25%. Berdasarkan penelitian sebelumnya ekstraksi rimpang lengkuas merah memiliki kandungan senyawa aktif yang diduga dapat digunakan sebagai senyawa antibakteri, dan ekstraksi dengan metode maserasi perlu dipelajari lebih lanjut untuk menghasilkan rendemen optimum.

Lengkuas merah memiliki kandungan senyawa metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, tannin, dan steroid yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri. Dilaporkan oleh Abubakar, dkk., (2019) ekstrak etanol lengkuas merah dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Klebsiella pneumonia* pada konsentrasi ekstrak sebesar 12,5%, 25%, 50%, 75%, dan 100% memiliki daya hambat 7,6 mm, 8,5 mm, 8,5 mm, 8,68 mm, dan 9,6 mm termasuk dalam penghambatan sedang. Aktivitas antibakteri lengkuas merah dapat ditingkatkan dengan formulasinya sebagai nanopartikel. Nanopartikel merupakan partikel skala nano yang dibuat dalam suatu sistem pembawa berukuran nanometer yang disebut *nanocarrier* (Abdssah., 2012). Salah satu sistem pembawa obat yaitu nanoemulsi yang merupakan dispersi dari minyak atau air yang di stabilisasi oleh surfaktan dan ko-surfaktan. Nanoemulsi berperan dalam penghantaran obat didalam matriks, dengan tujuan untuk memperbaiki kelarutan zat aktif yang sukar larut, memperbaiki bioavailabilitas yang buruk, memperbaiki sistem penghantaran obat sehingga dapat menuju daerah target.

Nanopartikel mengatur dan memperpanjang pelepasan obat selama proses penghantaran menuju target (Mohanraj dan Chen., 2006). Sistem pembawa obat yang dapat digunakan adalah polimer. Kitosan merupakan polimer alami yang menguntungkan karena bersifat *biodegradable*, *biokompatibel*, dan mukoadhesi. Namun, kitosan derajat *swelling* yang tinggi serta kelarutan yang rendah pada pH netral dan basa. Derajat *swelling* kitosan yang tinggi menyebabkan pelepasan obat menjadi kurang baik sehingga, perlu ditambahkan zat penstabil yang diharapkan tidak mengurangi kompatibilitas kitosan sebagai sistem pembawa dan penghantaran obat. Dalam penelitian ini dilakukan sintesis nanoemulsi ekstrak lengkuas merah dengan kitosan sebagai matriks pembawa dengan pembahan pengstabil dan tanpa penambahan pengstabil serta menguji stabilitas nanoemulsi yang dihasilkan. Penggunaan ekstrak etanol rimpang lengkuas merah sebagai nanoemulsi diharapkan memiliki aktivitas yang lebih baik sebagai antibakteri. Selain itu ekstrak etanol rimpang lengkuas merah sebagai antibakteri dinilai lebih ramah lingkungan, ekonomis. Keterbaharuan dalam penelitian ini yaitu dengan menjadikan ekstrak rimpang lengkuas merah sebagai nanoemulsi untuk ditujukan pada bakteri *Klebsiella pneumonia*, dalam penelitian sebelumnya hanya digunakan ekstrak lengkuas merah sebagai antibakteri.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas, rumusan masalah yang diambil pada penelitian ini adalah:

1. Bagaimana cara ekstraksi senyawa metabolit rimpang lengkuas merah dan pengaruh volume pelarut, waktu maserasi terhadap rendemen ekstrak rimpang lengkuas merah?
2. Bagaimana identifikasi senyawa aktif pada rimpang lengkuas merah?
3. Bagaimana uji kuantitatif kadar tannin dalam rimpang lengkuas merah?
4. Bagaimana ekstrak rimpang lengkuas merah dapat dibuat dalam sediaan nanoemulsi?
5. Bagaimana karakterisasi nanoemulsi rimpang lengkuas merah?
6. Bagaimana stabilitas nanoemulsi ekstrak lengkuas merah?

7. Bagaimana uji aktivitas antibakteri nanoemulsi ekstrak rimpang lengkuas merah?

1.3 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan penelitian ini adalah:

1. Melakukan ekstraksi senyawa metabolit sekunder rimpang lengkuas merah dan mengetahui pengaruh variasi volume pelarut serta waktu maserasi terhadap rendemen ekstrak rimpang lengkuas merah.
2. Mengetahui kandungan senyawa aktif dari rimpang lengkuas merah.
3. Melakukan uji kuantitatif kadar tannin dalam rimpang lengkuas merah.
4. Melakukan sintesis nanoemulsi ekstrak rimpang lengkuas merah.
5. Melakukan tahapan karakterisasi nanoemulsi ekstrak rimpang lengkuas merah.
6. Mengetahui stabilitas nanoemulsi ekstrak lengkuas merah.
7. Melakukan uji aktivitas antibakteri nanoemulasi ekstrak rimpang lengkuas merah.

1.4 Manfaat Penelitian

Adapun manfaat yang dapat diambil dari penelitian ini adalah:

1. Masyarakat: Nanoemulsi ekstrak rimpang lengkuas merah dapat menjadi alternatif treatment baru bagi masyarakat
2. Pendidikan: Menambah pengetahuan tentang senyawa bahan alam yang dapat digunakan sebagai obat dan terapi herbal.
3. Pemerintah: Memberikan informasi alternatif pengobatan yang disebabkan bakteri pathogen *Klebsiella pneumonia*.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bakteri *Klebsiella pneumoniae*

Bakteri *Klebsiella pneumoniae* merupakan bakteri patogen gram negatif, yang dapat menyebabkan penyakit infeksi dan ditemukan sebanyak 5% dalam saluran pernapasan. Bakteri *Klebsiella pneumoniae* mencapai saluran pernapasan melalui inokulasi langsung, penyebaran melalui pembuluh darah, inhalasi bahan aerosol, dan kolonisasi pada permukaan mukosa (Qolbi, dkk., 2018). Infeksi pernapasan oleh bakteri memiliki gejala klinis demam, nyeri otot, batuk, pilek, pendarahan dan penebalan lapisan mukosa organ (Elfidasari, dkk., 2013).

Saat ini pengobatan klinis untuk penanganan penyakit infeksi yang disebabkan bakteri *Klebsiella pneumoniae* adalah dengan pemberian antibiotik. Namun, *Klebsiella pneumoniae* merupakan bakteri patogen *Multidrug Resistance* (MDR). MDR *Klebsiella pneumoniae* merupakan bakteri resisten terhadap minimal satu dari tiga lebih dari golongan antibiotik (Khasanah, dkk., 2019). Dilaporkan Lubis, dkk., (2016) *Klebsiella pneumoniae* mengalami resisten terhadap ceftriaxone sebesar 66,67%, diikuti ciprofloxacin 44,44%, dan amoxicillin clavulanate acid 33,33%. Selain itu penelitian Apondi, dkk., (2016) melaporkan bahwa sebagian besar *Klebsiella pneumoniae* MDR resisten terhadap 80% pada antibiotik penisilin, sefalosporin, tetrasiklin, kloramfenikol, sulfonamide. Berdasarkan hasil penelitian tersebut, perlu dilakukan pencarian obat baru yang dapat secara efektif membunuh *Klebsiella pneumoniae*.

2.2 Senyawa Aktif Antibakteri dalam Lengkuas Merah (*Alpinia purpurata* Vieill) K. Schum)

Penggunaan bahan alam sebagai obat tradisional semakin meningkat, karena dinilai lebih mudah didapat, ekonomis, dan memiliki efek samping yang relatif rendah. Salah satu bahan alam yang dapat digunakan sebagai obat adalah lengkuas merah (*Alpinia purpurata* (Vieill) K. Schum). Rahmat., (2017) melaporkan lengkuas merah memiliki kandungan utama dari minyak atsiri lengkuas merah adalah metil-sinamat 48%, sineol 20-30%, kamfer 1%, seskuiterpen, dan

eugenol. Kandungan sentawa metabolit sekunder dalam ekstrak etanol 96% rimpang lengkuas merah adalah alkaloid, tannin, saponin, dan flavonoid. Penelitian yang dilakukan Simanjuntak, dkk., (2018) menginformasikan bahwa ekstrak etanol daun lengkuas merah mengandung senyawa metabolit sekunder seperti saponin, tannin, steroid, dan flavonoid. Bahkan Laksono, dkk., (2014) sudah melaporkan senyawa terpenoid dari ekstrak n-heksan rimpang lengkuas merah adalah senyawa 3,7,11-trimetil-1,6,10-dodekatrien-3-ol atau nerolidol.

Berdasarkan hasil penelitian Rialita, dkk., (2015) minyak atsiri lengkuas merah memiliki aktivitas antibakteri yang bersifat moderat terhadap bakteri patogen dan bakteri perusak pangan. Lengkuas merah memiliki nilai *minimum inhibitory concentration* (MIC) bakteri *Klebsiella pneumoniae* sebesar 0,078 mgmL⁻¹, bakteri *Staphylococcus aureus* sebesar 0,039 mgmL⁻¹, dan jamur *Candida albicans* sebesar 0,156 mgmL⁻¹. Dilaporkan oleh Kandou, dkk., (2016) ekstrak etanol rimpang lengkuas merah (*Alpinia purpurata* (Vieill) K. Schum) memberikan aktivitas antibakteri *Klebsiella pneumoniae* isolat sublum pasien bronkitis. Selain itu dilaporkan oleh Abubakar, dkk., (2019) ekstrak rimpang lengkuas merah memiliki daya hambat yang kuat terhadap bakteri *Klebsiella pneumoniae* yang resisten terhadap antibiotik setriakson pada konsentrasi 15% dan sangat kuat pada konsentrasi 100%. Aktivitas antibakteri ekstrak rimpang lengkuas merah akan semakin besar dengan kenaikan dosis yang diberikan.

Metode ekstraksi yang banyak digunakan dalam ekstraksi senyawa metabolit sekunder dalam lengkuas merah adalah maserasi. Fachriyah, dkk., (2018) melakukan ekstraksi dan fraksinasi dari ekstrak etanol, kemudian dipartisi menggunakan n-heksan, dan dilanjutkan etil asetat. Hasil menunjukkan ekstrak etanol memiliki rendemen yang lebih besar dari ekstrak n-heksan dan etil asetat sebesar 0,255%; 0,1025%; dan 0,25%. Kemudian, dilaporkan Ramadhaniyah., (2018) ekstraksi rimpang lengkuas merah 50 g dengan metode sokletasi dan pelarut n-heksan sebanyak 900 ml, selama 20 siklus sebanyak 3 kali memperoleh ekstrak kental 12 g dan rendemen 13%. Selanjutnya dilaporkan oleh Puasa, dkk., (2019) bahwa ekstraksi rimpang lengkuas merah sebanyak 150 g, dengan 750 ml etanol, selama 7 hari dengan sesekali pengadukan menghasilkan ekstrak kental sebanyak

7,7 gram. Bahkan Alta, dkk., (2019) melaporkan ekstraksi 1000 g lengkuas merah dengan etanol 70% dan rasio 1:10 selama 24 jam menghasilkan ekstrak kental sebanyak 160,44 g, rendemen 16,044%, berwarna kuning kecoklatan, dan bau khas lengkuas. Lusiani., (2018) juga melaporkan ekstraksi rimpang lengkuas merah dengan sebanyak 500 g dengan etanol 96% selama 3 hari menghasilkan ekstrak kental sebanyak 21 g dengan rendemen 5,25%. Beberapa penelitian yang telah dilaporkan sebelumnya ekstraksi rimpang lengkuas merah dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol dinilai lebih menguntungkan untuk menghasilkan ekstrak kental.

2.3 Nanoemulsi

Nanoteknologi merupakan *trendsetter* baru dalam dunia pengetahuan terutama dalam bidang kimia, biologi, farmasi, dan elektronik. Penghantaran obat dengan formulasi nano dinilai lebih menguntungkan karena dapat meningkatkan distribusi obat, luas permukaannya lebih besar, dan dapat menembus ruang ruang antar sel (Martien, dkk., 2012). Di Indonesia nanoteknologi untuk pengobatan terutama untuk herbal basih belum banyak dikembangkan. Komposisi bahan penyalut, bentuk dan ukuran nanoemulsi menjadi salah satu faktor dalam efektivitas senyawa obat (Prasetyorini, dkk., 2011).

Salah satu bahan penyalut yang dapat digunakan adalah kitosan. Kitosan bersifat *biodegradable*, *biocompatible*, dan mempunyai sifat matriks dalam penghantaran obat (Putri, dkk., 2018). Namun, kitosan memiliki derajat *swelling* yang tinggi dan memiliki kelarutan yang rendah pada pH netral dan basa. Derajat *swelling* ini menyebabkan pelepasan obat menjadi lebih cepat yang menyebabkan sistem penghantarannya kurang baik, sehingga perlu ditambahkan zat pengstabil. Penambahan zat pengstabil diharapkan mampu menggeser kelarutan kitosan dan menurunkan derajat *swelling* kitosan, sehingga sistem penghantaran kitosan menjadi lebih baik.

Dilaporkan Mardliyanti, dkk., (2012) konsentrasi dan rasio kitosan berpengaruh terhadap karakteristik nanoemulsi yang terbentuk. Karakteristik terbaik diperoleh pada konsentrasi 0,1% kitosan dan 0,1% TPP dan rasio 5:1 yaitu dihasilkan nanoemulsi dengan ukuran 1,3 nm dan distribusi unimodal. Dilaporkan

oleh Vishwakarma, dkk., (2019) nanoemulsi kotosan/TPP dengan rasio 1:1 memiliki ukuran partikel 17,33 nm. Dilaporkan Vishwakarma, dkk., (2019) nanoenkapsulasi kurkumin nanoemulsi kitosan/TPP dengan metode ion gelasi dapat meningkatkan kelarutan dalam air, stabilitas, serta efektif menghambat bakteri gram positif dan gram negatif. Ukuran nanoemulsi yang dihasilkan 135,2 nm dan zeta potensial +12.9 Mv. Penelitian yang dilakukan Kailaku, dkk., (2014) memformulasikan nanokapsul katekin dengan kitosan sebagai material penyalut. Formulasi dilakukan dengan memvariasikan konsentrasi dan rasio kitosan/TPP. Ukuran nanoemulsi terbaik yaitu 137,6 nm dengan formula konsentrasi larutan kitosan 0,2%, 0,4% katekin, dan 0,1% Na-TPP dan rasio kitosan/Na-TPP 7:1.

Berdasarkan beberapa penelitian yang telah dilaporkan sebelumnya dalam penelitian ini rimpang lengkuas merah digunakan sebagai obat untuk mengatasi bakteri *Klebsiella pneumoniae*. Lengkuas merah di ekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Untuk menghasilkan karakteristik terbaik nanoemulsi lengkuas merah disintesis menggunakan penambahan zat pengstabil dan tanpa pengstabil dengan metode, rasio, serta konsentrasi merujuk pada penelitian Mardliyanti, dkk., (2012).

BAB III

DASAR TEORI

3.1 Tanaman Lengkuas Merah (*Alpinia purpurata* K.Schum)

3.1.1 Karakteristik dan klasifikasi tanaman lengkuas merah

Lengkuas merah termasuk dalam keluarga *Zingiberaceae* yang dikenal sebagai tanaman obat. Lengkuas merah hidup di dataran Asia Tenggara yang memiliki iklim tropis. Rimpang lengkuas merah memiliki aroma yang menyengat sehingga dimanfaatkan sebagai bumbu atau obat-obatan. Tanaman lengkuas merah ditampilkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Tanaman lengkuas merah.

Lengkuas merah memiliki tinggi batang 1-1,5 meter dengan batang semu berupa pelepah-pelepah daun. Lengkuas merah memiliki rimpang kecil, tebal, berdaging, berbentuk silindris dengan diameter 2-4 cm, dan bercabang-cabang. Bagian luar rimpang berwarna coklat kemerahan, sedangkan dagingnya berwarna putih kemerahan (Silalahi, dkk., 2018). Bunga lengkuas merupakan bunga majemuk berbentuk lonceng, berbau harum, panjang bunga 4 cm.

Berikut adalah klasifikasi tanaman lengkuas merah (Khumairoh, 2018).

Kingdom	: <i>Plantae</i>
Divisi	: <i>Spermatophyta</i>
Subdivisi	: <i>Angiospermae</i>
Class	: <i>Monocotyledoneae</i>
Order	: <i>Zingiberales</i>
Family	: <i>Zingiberaceae</i>
Genus	: <i>Alpinia</i>
Spesies	: <i>Alpinia purpurata K.Schum</i>

3.1.2 Kandungan dan manfaat tanaman lengkuas merah

Lengkuas merah telah banyak diteliti memiliki berbagai aktifitas biologis, seperti antibakteri, antijamur, antikanker, antitumor, dan antioksidan (Rialita, dkk., 2015). Rimpang lengkuas merah segar mengandung air 75%, protein 3,07%, karbohidrat 22,44%, dan senyawa kamferid 0,07% (Tambun, dkk., 2016). Kandungan kimia dari lengkuas merah adalah 1% minyak atsiri berwarna kuning kehijauan yang terdiri dari senyawa metil-sinamat sebesar 48%, sineol 20-30%, eugenol, kamfer 1%, seskuiterpen, α -pinen, galangin (Tambun, dkk., 2016). Penelitian Subramanian dan Suja., (2011) kandungan kimia dari ekstrak etanol rimpang lengkuas merah adalah tannin sebesar 12,5%, flavonoid sebesar 0,85%, alkaloid sebesar 0,38%, fenol sebesar 9,5%, resin, glikosida, dan saponin.

3.2 Metode Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses pemisahan bahan (simplisia) dari campurannya dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Proses ekstraksi dihentikan ketika tercapai kesetimbangan antara kosentrasi senyawa dalam pelarut dengan konsentrasi dalam sel tanaman (Mukhriani, 2014). Pemilihan metode ekstraksi didasarkan pada sifat bahan dan sifat senyawa yang akan diisolasi. Prinsip dasar dari metode ekstraksi yaitu proses perpindahan massa komponen aktif kedalam pelarut, dimana perpindahan mulai terjadi pada lapisan antar muka, kemudian berdifusi masuk kedalam pelarut (Sudjad., 1986). Sebelum dilakukan pemilihan metode ekstraksi target ekstraksi perlu diketahui.

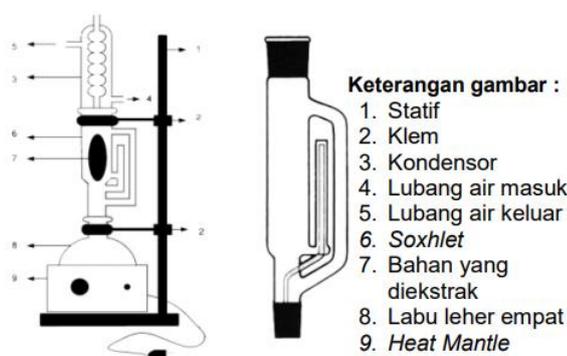
Maserasi merupakan metode ekstraksi yang digunakan untuk menarik senyawa metabolit sekunder dari suatu padatan dengan teknik perendaman dengan pelarut yang sesuai. Pada proses perendaman simplisia akan mengalami pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan di dalam dan di luar sel, sehingga metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut. Pelarut yang mengalir ke dalam sel akan menyebabkan protoplasma membengkak dan bahan kandungan sel akan larut sesuai kelarutannya (Yulianingtyas, dkk., 2016). Kemampuan melarutkan yang tinggi berhubungan kepolaran pelarut dan kepolaran senyawa yang diekstrak.

Maserasi memiliki keuntungan yaitu prosesnya sederhana, relatif murah, tidak memerlukan peralatan yang rumit, tidak perlu pemanasan sehingga kecil kemungkinan bahan alam menjadi rusak atau terurai, kontak antar sampel dan pelarut yang cukup lama (Triastiari, dan Harijono., 2019). Terdapat beberapa faktor dalam proses ekstraksi yang memengaruhi hasil ekstraksi diantaranya jenis pelarut, rasio berat bahan dengan volume pelarut, suhu, pengadukan, waktu ekstraksi, dan ukuran sampel. Volume pelarut berpengaruh terhadap rendemen ekstrak. Hal ini disebabkan semakin banyak pelarut maka pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara di dalam dan di luar sel berjalan lebih optimal sehingga semakin banyak senyawa metabolit sekunder yang akan terlarut dalam pelarut.

Rasio berat bahan dengan volume pelarut dapat menambah difusifitas dari pelarut ke dalam sel dan meningkatkan desorpsi senyawa dalam sel (Yulianingtyas, dkk., 2016). Waktu maserasi yang semakin lama maka semakin banyak senyawa yang terekstrak. Hal ini disebabkan waktu kontak antara simplisia dengan pelarut menjadi semakin lama yang menyebabkan kemampuan pelarut untuk mengekstrak semakin optimal (Koirewoa, 2012). Semakin tinggi suhu maserasi maka kecepatan perpindahan masa dari zat terlarut ke pelarut akan semakin tinggi karena suhu mempengaruhi nilai koefisien transfer masa dari suatu komponen (Damanik, dkk., 2014). Pemilihan pelarut yang sesuai merupakan salah satu faktor penting dalam proses maserasi. Pelarut yang digunakan harus mampu menarik sebagian besar

senyawa metabolit sekunder, selain itu mudah dipisahkan dan dimurnikan kembali (Damanik, dkk., 2014).

Soxhletasi adalah metode ekstraksi dengan pemanasan, dimana pelarut yang ada di dalam labu dipanaskan sesuai titik didihnya. Uap pelarut akan naik melalui pipa pendingin sehingga mengembun dan menetes pada bahan yang diekstrak. Pelarut akan merendam bahan dan bila tinggi pelarut sudah melebihi tinggi pipa pengalir pelarut akan mengalir ke labu soxhlet. Pelarut yang terkumpul akan dipanaskan lagi sehingga pelarut akan menguap dan ekstrak akan terkumpul pada labu. Alat ekstraksi soxhlet ditampilkan pada Gambar 2.



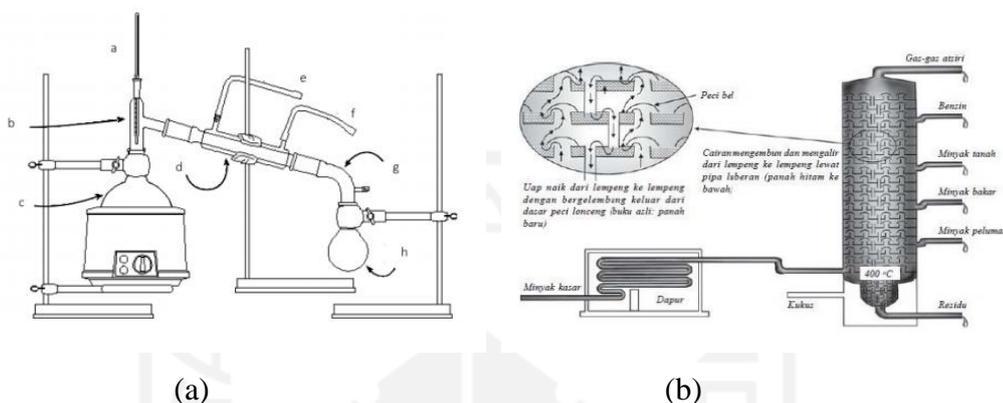
Gambar 2. Alat ekstraksi soxhlet

(Sumber: Wijaya, dkk., 2019).

Keuntungan metode soxhletasi adalah ekstraksi kontinyu, tidak membutuhkan banyak pelarut, dan tidak memakan waktu. Kerugian dari metode ini adalah senyawa yang bersifat termolabil dapat terdegradasi akibat pemanasan terus-menerus (Mukhriani., 2014).

Distilasi adalah proses ekstraksi dengan dasar perbedaan titik didih. Beberapa macam distilasi yaitu distilasi sederhana, distilasi air, distilasi fraksinasi, dll. Distilasi fraksinasi merupakan proses pemisahan campuran berdasarkan perbedaan titik didih yang berdekatan sehingga terbentuk beberapa fraksi. Distilasi fraksi dilakukan dengan pemanasan secara kontinyu, komponen pada titik didih rendah akan menguap terlebih dahulu. Jika komponen dengan titik didih rendah telah habis maka temperatur akan terus naik sampai titik didih komponen selanjutnya. Distilasi sederhana adalah metode pemisahan berdasarkan perbedaan

titik didih pada tekanan atmosfer. Distilasi sederhana dapat digunakan untuk campuran dengan perbedaan titik didih kurang dari 20 °C. perbedaan distilasi sederhana dengan distilasi fraksinasi adalah adanya kolom fraksinasi (Arman, dkk., 2014). Alat distilasi sederhana dan distilasi fraksinasi ditampilkan pada Gambar 3.



Gambar 3. (a) Distilasi sederhana, (b) distilasi fraksinasi

(Sumber: Arman, dkk., (2014), Wijaya, dkk., (2019))

Penyulingan merupakan salah satu metode untuk memisahkan minyak atsiri dari bahannya. Proses penyulingan dapat dilakukan dengan air, uap, uap dan air. Kelebihan metode penyulingan dengan air adalah waktu yang dibutuhkan singkat karena bahan langsung berkontak dengan air. Kekurangan metode ini peluang terdegradasinya minyak oleh air. Kelebihan metode distilasi uap air adalah membutuhkan sedikit air sehingga waktu penyulingan relative singkat, efisien dalam penggunaan dan menghasilkan minyak dalam jumlah yang cukup banyak. Metode penyulingan dengan uap memiliki kelebihan kualitas minyak dan rendemen tinggi karena tidak bercampur dengan air. Kekurangan metode ini membutuhkan peralatan yang lebih kompleks (Porawati, dan Ari., 2019).

3.3 Senyawa Metabolit Sekunder

Metabolit sekunder merupakan senyawa yang tidak terlibat langsung dalam pertumbuhan. Senyawa metabolit sekunder berfungsi untuk mempertahankan diri karena bersifat racun bagi hewan, dan dapat digunakan sebagai *lead compounds* dalam penentuan senyawa obat. Senyawa metabolit sekunder dihasilkan pada kondisi tertentu, diproduksi dalam jumlah terbatas, dan memiliki fungsi yang spesifik. Senyawa metabolit sekunder yang umumnya ada dalam tumbuhan adalah

flavonoid, alkaloid, saponin, steroid, dan tannin. Pemanfaatan senyawa metabolit sekunder diantaranya sebagai antioksidan, antikanker, antiinflamasi, pestisida, dll (Ergina, dkk., 2014).

3.3.1 Flavonoid

Flavonoid merupakan salah satu senyawa metabolit sekunder yang banyak ditemukan dalam jaringan tumbuhan. Flavonoid termasuk dalam golongan senyawa fenolik dengan struktur C6-C3-C6 (Redha, 2010). Flavonoid memiliki aktivitas menghambat pertumbuhan bakteri, virus, dan jamur. Flavonoid bersifat polar sehingga lebih mudah menembus lapisan peptidoglikan yang bersifat polar dari lapisan lipid yang bersifat polar. Karena kepolaranya flavonoid akan larut dalam pelarut polar seperti etanol (EtOH), methanol (MeOH), butanol (BuOH), aseton, dimetil sulfoksida (DMSO), air, dll (Markham, 1988).

Flavonoid sebagai antibakteri memiliki 3 cara kerja yaitu menghambat sintesis asam nukleat, menghambat fungsi membran, dan menghambat metabolisme energi. Mekanisme antibakteri flavonoid menghambat sintesis asam nukleat, dimana cincin A dan B pada flavonoid yang memegang peran penting dalam ikatan hidrogen dengan menghambat pembentukan DNA dan RNA. Senyawa flavonoid dapat menyebabkan kerusakan permeabilitas dinding sel bakteri, mikrosom, dan lisosom sebagai hasil interaksi antara flavonoid dan DNA bakteri (Nuralifah, dkk., 2019).

Mekanisme antibakteri senyawa flavonoid untuk menghambat fungsi membran dengan membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut sehingga merusak membran sel yang diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler (Amalia, dkk., 2017). Selain itu penghambatan metabolisme energi flavonoid dengan cara menghambat penggunaan oksigen oleh bakteri. Flavonoid menghambat pada sitokrom C reduktase dalam proses biosintesis makromolekul, apabila proses biosintesis makromolekul terganggu maka molekul bakteri tersebut tidak akan berkembang menjadi molekul yang kompleks (Sapara, dkk., 2016).

3.3.2 Alkaloid

Alkaloid merupakan senyawa dengan struktur heterosiklik, bersifat non polar, bersifat basa, dan memiliki satu atau lebih atom nitrogen. Alkaloid sulit larut

dalam pelarut polar tetapi mudah larut dalam pelarut semipolar (Maulianawati dan Awaludin, 2018). Alkaloid bersifat basa, sehingga dapat mengganti basa mineral dalam mempertahankan kesetimbangan ion dalam tumbuhan. Alkaloid memiliki aktivitas sebagai antidiare, antimikroba, antidiabetes, dan antimalarial, tetapi pada tanaman alkaloid bersifat beracun yang berguna melindungi dari serangga dan herbivora (Ningrum, dkk., 2016).

Mekanisme antibakteri alkaloid adalah senyawa alkaloid memiliki atom nitrogen yang dapat bereaksi dengan asam amino penyusun dinding sel bakteri dan DNA bakteri. Interaksi antara alkaloid dengan asam amino menyebabkan perubahan struktur dan susunan asam amino, sehingga menyebabkan perubahan keseimbangan genetik pada rantai DNA yang mengakibatkan kerusakan dan mendorong terjadinya lisis sel bakteri sehingga menyebabkan kematian sel bakteri (Dewangga, dkk., 2019). Selain itu, alkaloid dapat menghambat sintesis dinding sel bakteri dan mengganggu komponen peptidoglikan sehingga dinding sel bakteri tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel (Nirwana, dkk., 2017).

3.3.3 Saponin

Saponin merupakan golongan senyawa glikosida yang bersifat polar tetapi mempunyai struktur steroid, sehingga akan membentuk koloidal serta buih ketika dilakukan penggojokan (Maulianawati, dkk., 2018). Saponin memiliki aglikon berupa steroid dan triterpenoid. Glikosil dari saponin terikat pada posisi C3 dan ada dua rantai gula yang menempel pada posisi C3 dan C17 (Yanuartono, dkk., 2017). Lebih dari 11 jenis saponin yang telah teridentifikasi diantaranya dammaranes, tirucallanes, lupanes, hopanes, oleananes, taraxasteranes, ursanes, cycloartanes, lanostanes, cucurbitanes dan steroid (Low., 2015).

Saponin memiliki aktifitas sebagai antibakteri, antikanker, antivirus. Mekanisme antibakteri saponin dengan cara menurunkan tegangan permukaan sehingga mengakibatkan naiknya permeabilitas atau kebocoran sel dan mengakibatkan senyawa intraseluler akan keluar (Nuria., 2009). Menurut Cavalieri dkk., (2005), senyawa ini berdifusi melalui membran luar dan dinding sel yang rentan, lalu mengikat membran sitoplasma dan mengganggu dan mengurangi kestabilan itu. Hal ini menyebabkan sitoplasma bocor keluar dari sel yang

mengakibatkan kematian sel. Agen antimikroba yang mengganggu membran sitoplasma bersifat bakterisida (Ngajow, dkk., 2013).

3.3.4 Tannin

Tannin merupakan senyawa polifenol yang memiliki berat molekul 500-3000 yang terdiri dari gugus hidroksil dan karbonil. Senyawa tannin terdiri dari senyawa tannin terkondensasi dan tannin terhidrolisis. Tannin terkondensasi terjadi karena reaksi polimerisasi (kondensasi) antar flavonoid, sedangkan tannin terhidrolisis terbentuk karena reaksi esterifikasi asam fenolat dan gula (Puspita., 2010). Tannin terhidrolisis dan tannin terkondensasi memiliki aktivitas sebagai antiinflamasi, antimikroba, antidiarema dan antioksidan.

Mekanisme antibakteri tannin dengan cara menyebabkan sel bakteri menjadi lisis. Hal ini terjadi karena tannin memiliki target pada dinding polipeptida dinding sel bakteri sehingga pembentukan dinding sel menjadi kurang sempurna dan kemudian sel bakteri akan mati. Hal ini menyebabkan sel bakteri menjadi lisis karena tekanan osmotik maupun fisik sehingga sel bakteri akan mati. Selain itu, menurut Akiyama, dkk., (2001) kompleksasi dari ion besi dengan tannin dapat menjelaskan toksisitas tannin. Mikroorganisme yang tumbuh di bawah kondisi aerobik membutuhkan zat besi untuk berbagai fungsi, termasuk reduksi dari prekursor ribonukleotida DNA. Hal ini disebabkan oleh kapasitas pengikat besi yang kuat oleh tannin. Tannin juga memiliki kemampuan untuk menginaktifkan enzim bakteri serta mengganggu jalannya protein pada lapisan dalam sel (Ngajow dkk, 2013).

3.4 Nanoemulsi

Nanoemulsi didefinisikan sebagai partikel dengan ukuran 10-1000 nm. Nanoemulsi digunakan dalam penghantaran obat didalam matriks, dengan tujuan untuk memperbaiki kelarutan zat aktif yang sukar larut, memperbaiki bioavailabilitas yang buruk, memperbaiki sistem penghantaran obat sehingga dapat menuju daerah yang spesifik, meningkatkan stabilitas zat aktif dari degradasi lingkungan (penguraian enzimatik, oksidasi, dan hidrolisis), memperbaiki absorpsi senyawa makromolekul (Mohanraj dan Chen., 2006). Nanoemulsi terbagi atas nanokristal dan *nanocarrier*.

Nanokristal adalah nanoemulsi yang terbentuk dari penggabungan molekul yang membentuk kristal dari proses penyalutan tipis dengan surfaktan (Abdassah., 2017). Proses pembuatan nanokristal diperlukan sedikit surfaktan untuk stabilisasi permukaan karena gaya elektrostik sehingga mengurangi keracunan oleh bahan tambahan (Rawat, dkk., 2006). Kelebihan nanokristal dapat menghantarkan obat ke unit yang lebih kecil dalam tubuh, mengatasi resistensi, dan dapat meningkatkan efisiensi penghantaran obat dengan meningkatkan daya larut (Faruq., 2018).

Nanocarrier adalah suatu sistem pembawa dengan ukuran nanometer. Jenis *nanocarrier* diantaranya *nanotube*, *nanoliposom*, nanoemulsi berbasis polimer. Nanotube adalah partikel dengan ukuran nano yang diatur berbentuk lembaran dengan rongga ditengah dan ber dinding ganda. Nanotube digunakan dalam sistem penghantaran obat dalam gen karena bentuknya menyerupai asam nukleat (Abdssah., 2017).

Nanoliposom adalah nanoemulsi yang terbentuk dengan konsentrat vesikel lapis ganda yang terdapat cairan dengan dibungkus membran yang terbuat dari fosfolipid (Rawat, dkk., 2006). Liposom memiliki kelebihan dapat meningkatkan efikasi dan indeks terapi serta dapat meningkatkan stabilitas. Hal ini disebabkan karena liposom lebih mudah berinteraksi dengan membran sel bakteri. Sifat fisik dari nanoliposom dapat dipengaruhi oleh kecepatan pencampuran, durasi dan suhu pencampuran (Rini, dkk., 2016).

Nanoemulsi merupakan sediaan disperse transparan dari minyak dan air yang distabilisasi oleh molekul surfaktan dan ko-surfaktan Nanoemulsi berbasis polimer terbentuk dengan polimer sebagai matriksnya. Polimer adalah rantai berulang dari suatu monomer. Polimer memiliki sifat kimia yang khas, umumnya dengan adanya gugus fungsi spesifik yang dapat berinteraksi secara spesifik (Martien, dkk., 2012). Nanokapsul merupakan nanoemulsi yang terbentuk dengan proses penyalutan dalam bentuk nanometer (Mohanraj, dkk., 2006). Nanokapsul dapat dibuat dengan proses gelasi ionik menggunakan pengadukan mekanik. Polimer yang dapat digunakan dalam pembuatan nanoemulsi meliputi polisakarida,

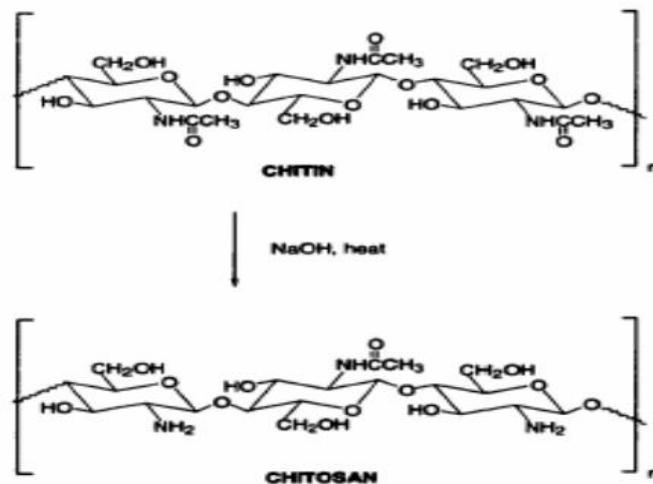
poliakrilamid, polikaprolakton, protein, polipeptida, dan poliglikolid. Polisakarida merupakan polimer yang populer dimanfaatkan sebagai sebagai penghantar obat.

3.5 Material Pembawa Nanoemulsi

3.5.1 Kitosan

Kitosan adalah polisakarida alami yang diperoleh dari proses desetilasi senyawa kitin dengan rumus molekul $C_6H_9NO_3$ atau poli (β -(1,4)-2-amino-2-deoksi-D-Glukopiranos). Kitosan merupakan padatan berwarna putih yang tidak larut dalam larutan alkali, air, namun larut dalam asam. Kitosan memiliki viskositas dan berat molekul yang tinggi. Kitosan memiliki sifat kationik dalam lingkungan asam karena adanya gugus amina yang dapat terprotonasi oleh H^+ dari asam, yang dapat berinteraksi dengan polimer anionic membentuk kompleks polielektrolit (KPE). Pembentukan kompleks antara kitosan dengan polimer anionic memiliki kemampuan untuk menghambat pelepasan obat, sehingga kitosan dapat dimanfaatkan dalam sistem pembawa dan pelepasan obat (Sagita, dkk., 2010).

Kitin dapat diperoleh dari cangkang serangga atau krustasea seperti kepiting, dan udang. Kitosan bersifat *biodegradable*, *biocompatible*, dan tidak beracun (Vishwakarma, dkk., 2019). Kitin diperoleh dengan 3 tahap yaitu demineralisasi, deproteinasi, dan depigmentasi. Proses deproteinasi adalah proses penghilangan protein dengan basa kuat. Demineralisasi merupakan proses penghilangan kandungan mineral menggunakan asam. Tahap depigmentasi adalah proses penghilangan warna setelah proses demineralisasi. Hasil dari proses depigmentasi disebut kitin. Selanjutnya dilakukan proses deasetilasi kitin menjadi kitosan dengan basa kuat yang bertujuan memutus ikatan antara gugus asetil ($-COCH_3$) sehingga berubah menjadi gugus amina ($-NH_2$) (Harjanti., 2014). Reaksi pembentukan kitosan dari kitin ditampilkan pada Gambar 4.



Gamabar 4. Reaksi pembentukan kitosan dari kitin

Sumber: (Suhardi., 1993) dalam (Harjanti., 2014).

Kitosan yang dihasilkan dikarakterisasi untuk mengetahui mutu kitosan. Karakterisasi mutu kitosan dilakukan meliputi kadar air, kelarutan dalam asam asetat 2%, derajat deasetilasi, tekstur, dan warna. Derajat deasetilasi (DD) adalah parameter yang menunjukkan gugus asetil yang dapat dihilangkan dari kitin. Derajat deasetilasi ditentukan menggunakan spektroskopi FTIR. Metode yang dapat digunakan adalah *based line* (garis dasar). Metode *based line* menurut Domszy dan Roberts dengan mencatat puncak tertinggi dan mengukur pita dasar yang dipilih (Bahri, dkk., 2015). Rumus perhitungan DD adalah:

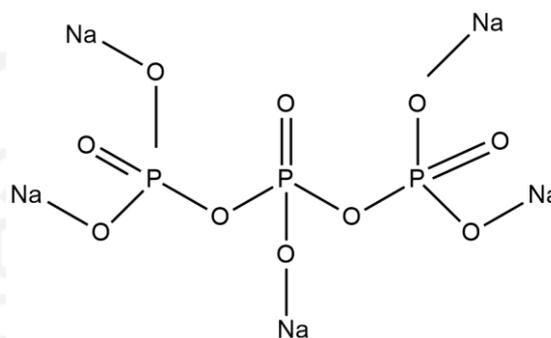
$$DD = 100 - \left[\left(\frac{\text{Amida}}{\text{Amina}} \right) \times \frac{100}{1,33} \right]$$

Keterangan: Amida adalah absorbansi pada gugus amida (bilangan gelombang 1655 cm^{-1}), Amina adalah absorbansi pada gugus amina (bilangan gelombang $3500\text{-}3200 \text{ cm}^{-1}$), faktor 1,33 adalah nilai perbandingan $\frac{\text{Amida}}{\text{Amina}}$ untuk kitosan pada proses deasetilasi sempurna (100%).

Kitosan sebagai material nano memiliki aktivitas biologi seperti antioksidan, antibakteri, antihiperlipidemik, antifungal, antikanker, dan antimalarial. Aktivitas antibakteri kitosan pada bakteri gram negatif dengan cara memblokir aliran nutrisi pada bakteri yang menyebabkan kematian sel (Damayanti, dkk., 2016). Aktivitas antibakteri kitosan dipengaruhi oleh berat molekul dan

derajat deasetilasi. Berat molekul dan derajat deasetilasi yang lebih besar menunjukkan aktifitas yang besar. Kitosan memiliki gugus fungsi amina (-NH₂) dengan muatan positif yang mampu berikatan dengan dengan dinding sel bakteri yang bermuatan negatif. Interaksi ini akan mengganggu aktivitas mikroba (Killay., 2013).

3.5.2 Natrium Tripolifosfat



Gambar 5. Struktur kimia natrium tripolifosfat.

Natrium Tripolifosfat (STPP) merupakan senyawa anorganik dengan bentuk buturan-butiran halus berwarna putih. Senyawa ini memiliki rumus molekul Na₅P₃O₁₀, mudah larut dalam air, sukar larut dalam methanol, tidak larut dalam etanol, dietil eter, dan n-oktanol. Natrium tripolifosfat memiliki sifat sebagai anion multivalent yang dapat membentuk ikatan silang (*crosslink*). Natrium tripolifosfat sebagai agen taut silang penggunaannya dapat mudah di kontrol dengan mengatur pH larutan dan rasionya (Astriyani., 2011).

Natrium tripolifosfat banyak digunakan sebagai bahan tambah makanan yang berperan untuk meningkatkan tekstur dan sebagai bahan pengawet. Senyawa ini bersifat tidak beracun, dapat terdegradasi secara kimia dan enzimatik yang telah di setujui oleh *Food and Drug Administration*, US Amerika (Husniati, dan Eka., 2014). Selain itu STPP memiliki toksisitas yang rendah dengan nilai LD₅₀ setelah pemberian oral > 1000 mg/kg BB, serta tidak dapat menimbulkan karsinogenik dan mutagenik (Astriyani., 2011).

3.6 Ultrasonikasi

Sonikasi merupakan aplikasi penggunaan energi suara pada proses pengadukan dengan tujuan yang bermacam-macam. Sonikasi dapat digunakan untuk mempercepat proses pelarutan suatu materi dengan prinsip pemecahan reaksi

intramolecular. Sonikasi menggunakan gelombang ultrasonik pada rentang 20 KHz-10 MHz. Gelombang ultrasonik merupakan gelombang longitudinal yang tidak dapat didengar oleh telinga manusia karena memiliki frekuensi yang tinggi, dapat merambat dalam media padat dan cair (Candani, dkk., 2018).

Iradiasi ultrasonik sangat berkaitan dengan kavitasi, yaitu pembentukan, pertumbuhan, dan pemecahan gelembung dalam cairan. Kavitasi adalah proses pembentukan gelembung-gelembung karena meningkatnya tekanan dari adanya gelembung ultrasonik. Gelembung-gelembung ini bersifat tidak stabil dan mudah pecah ketika gelembung tidak cukup lagi menyerap energi. Pecahnya gelembung ini melibatkan energi yang besar dan menghasilkan efek panas (Sabathani, dkk., 2018). Ultrasonik dengan intensitas tinggi dapat memberikan efek pada perubahan fisika dan kimia yang luas karena memiliki energi yang cukup tinggi dapat berikatan pada zat lain dalam waktu singkat dengan tekanan tinggi. Ketika gelombang ultrasonik yang diberi amplitudo cukup besar maka regangan gelombang dapat memecah ikatan molekul antar larutan. Gas gas terlarut dalam larutan akan terperangkap akibat molekul larutan yang ikatannya terpecah ketika timbul rapatan kembali. Akibatnya dihasilkan bola- bola berongga yang dikenal efek kavitasi. Gelembung ini memiliki diameter yang dapat membesar sehingga ukurannya maksimum akan meletus menghasilkan energi panas. Efek ultrasonik ultrasonik intensitas tinggi salah satunya emulsifikasi (Wahid., 2001).

Gelombang ultrasonik tidak secara langsung berinteraksi dengan molekul molekul untuk menginduksi suatu perubahan kimia. Interaksi gelombang ultrasonik dengan molekul terjadi melalui perantara media cairan. Gelombang ultrasonik yang dihasilkan oleh tenaga listrik ditersarkan melalui media cair menuju medan yang dituju melalui fenomena kavitasi yang menyebabkan terjadinya perubahan temperature dan tekanan didalam cairan dimana reaksi terjadi (Kencana., 2009).

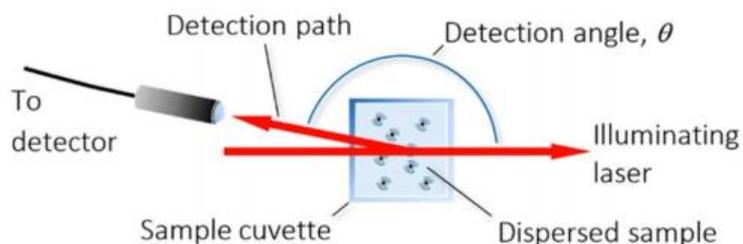
3.7 Karakterisasi Nanoemulsi

Karakterisasi nanoemulsi diperlukan untuk mengetahui sifat mekanik dari perilaku nanoemulsi. Karakterisasi dilakukan untuk memperkirakan kinerja nanoemulsi, pengembangan formulasi, dan mengatasi masalah dalam pembuatan

(Abdassah., 2017). Karakterisasi nanoemulsi dapat dilakukan dengan analisis ukuran dan distribusi ukuran, zeta potensial, morfologi nanoemulsi.

3.7.1 Particle size analyzer (PSA)

Pengukuran distribusi dan ukuran partikel merupakan salah satu karakterisasi dari nanoemulsi. Pengukuran distribusi dan ukuran partikel dengan PSA didasarkan pada prinsip metode Dynamic Light Scattering (DLS). Prinsip pengukuran Particle size analyzer (PSA) adalah pendispersian partikel kedalam media cair, sehingga partikel tidak saling beraglomerasi dan partikel terukur adalah single particle (Silfia, dkk., 2018). Prinsip kerja alat didasarkan pada interaksi cahaya dengan partikel melalui difraksi, refleksi, absorpsi, dan refraksi. Sumber cahaya laser dilewatkan pada sampel, kemudian cahaya yang dihamburkan akan ditangkap oleh detector karena gerak Brown partikel koloid. Gerak brown yang terjadi pada partikel zat cair akan mengalami tumbukan satu sama lain maupun tumbukan dengan dinding ruang. Pengukuran PSA berdasarkan difraksi laser dimana partikel akan dihamburkan oleh cahaya pada sudut yang berbeda. Partikel dengan ukuran yang besar dengan sudut kecil sedangkan partikel dengan ukuran kecil akan dihamburkan pada sudut besar (Muchtar, dkk., 2015). Skema DLS ditampilkan pada Gambar 6.



Gambar 6. Skema DLS untuk mendeteksi hamburan balik

(Sumber: Malm, dan Jason., 2019)

Parameter yang digunakan untuk menilai tingkat keseragaman ukuran partikel adalah nilai indeks polidispersitas (PI) dari distribusi ukuran partikel, dan parameter untuk menentukan stabilitas adalah nilai potensial zeta (Mardiyati, dkk., 2012). Indeks polidispersitas merupakan ukuran lebarnya distribusi ukuran partikel yang menunjukkan penyebaran distribusi ukuran partikel (Silfia, dkk.,

2018). Nilai indeks polidispersitas berada diantara rentang 0-1, dimana nilai PI yang mendekati 0 menunjukkan distribusi partikel yang homogen atau seragam sedangkan nilai indeks polidispersitas $>0,5$ menunjukkan heterogenitas yang tinggi.

Zeta potensial adalah tegangan elektrostatik yang terjadi pada bidang permukaan partikel akibat interaksi antar muatan pada permukaan partikel atau dengan lingkungan medium partikel (Mujamilah, dkk., 2013). Nilai zeta potensial digunakan untuk mengkarakterisasi sifat muatan permukaan partikel yang berkaitan dengan interaksi elektrostatik nanoemulsi (Taurina, dkk., 2017). Nanoemulsi dengan nilai zeta potensial lebih kecil dari -30 mv dan lebih besar dari +30 mv memiliki stabilitas yang lebih baik (Murdock, dkk., 2008), karena muatan partikel dapat mencegah agregasi. Sistem nanoemulsi yang memiliki nilai zeta potensial yang lebih rendah akan mudah membentuk agregat karena adanya ikatan Van Der Waals.

3.7.2 Spektrofotometer UV-Vis

Spektrofotometer Uv-Vis merupakan suatu alat yang digunakan untuk mengukur serapan yang dihasilkan dari interaksi kimia antara radiasi elektromagnetik dengan molekul atom dari suatu zat kimia pada daerah Uv-Vis (Sari, dkk., 2017). Spektrofotometer Uv-Vis merupakan suatu teknik pengukuran yang di dasarkan pada Hukum Lamber-Beer. Prinsip kerja spektrofotometer adalah seberkas sinar yang dilewatkan pada suatu larutan pada panjang gelombang tertentu, menyebabkan sebagian sinar tersebut ada yang diteruskan dan sebagian yang lain diserap oleh larutan. Besarnya sinar (A) berbanding lurus dengan konsentrasi suatu zat (C) dan jarak yang ditempuh sinar (a) dalam larutan (b) (Warono, dkk., 2013).

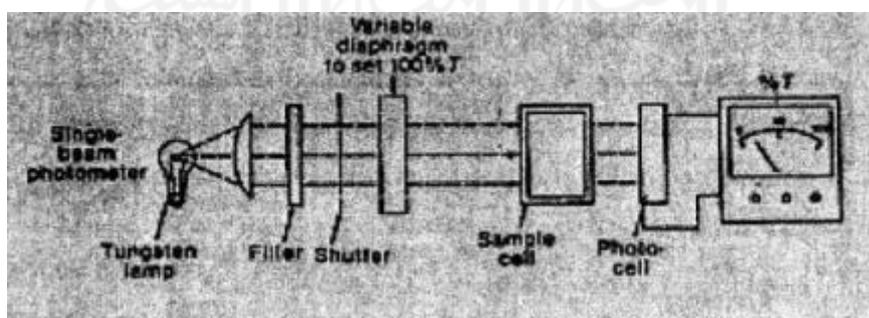
$$A = a.b.c$$

Keterangan :

- A : Serapan (absorbansi)
- c : Konsentrasi (M)
- a : koefisiensi ekstinsing molar (M-1 cm-1)
- b : Tebal kuvet (cm)

Pada Spektrofotometer Uv-Vis sampel yang diukur dalam bentuk larutan. Analit yang dapat diukur adalah analit berwarna atau yang dapat dibuat warna. Analit berwarna adalah analit yang memiliki sifat menyerap cahaya secara alami, sedangkan analit yang dibuat berwarna adalah analit yang tidak berwarna sehingga harus ditambahkan zat tertentu untuk membentuk senyawa yang dapat menyerap cahaya pada panjang gelombang yang spesifik. Pembentukan warna untuk analit yang tidak berwarna dapat dilakukan dengan cara membentuk senyawa kompleks atau dioksidasi sehingga analit menjadi berwarna (Warono, dkk., 2013). Ketika suatu molekul menyerap cahaya pada energi yang sesuai menyebabkan tereksitasinya electron valensi dari orbital molekul terisi tertinggi (HOMO) ke orbital molekul kosong terendah (LUMO). Terjadinya eksitasi electron disebabkan adanya gugus kromofor. Gugus kromofor adalah gugus fungsional tidak jenuh yang memberikan serapan pada daerah ultraviolet dan daerah visible (Sari, dkk., 2017).

Spektrofotometer Uv-Vis ini terdiri dari dua jenis yaitu single beam dan double beam. Perbedaan pada kedua jenis alat ini adalah berkas sinar dan pengukurannya. Pengukuran dengan spektrofotometer double beam dapat dilakukan secara bersamaan antara blanko dengan sampel. Sedangkan pengukuran dengan spektrofotometer single beam tidak dapat dilakukan secara bersamaan antara blanko dengan sampel. Secara umum spektrofotometer Uv-Vis terdiri dari sumber radiasi, monokromator, sel, foto sel, detector. Bagian alat spektrofotometer Uv-Vis ditampilkan pada Gambar 7.



Gambar 7. Bagan alat spektrofotometer Uv-Vis

(Sumber: Warono, dkk., 2013)

Sumber radiasi berfungsi untuk memberikan energi radiasi pada daerah panjang gelombang. Sumber radiasi yang digunakan pada alat spektrofotometer Uv-Vis adalah lampu hidrogen atau deuterium dan lampu filament. Lampu deuterium digunakan untuk mendapatkan energi radiasi pada daerah ultraviolet sampai 350 nm. Lampu filamen digunakan untuk mendapatkan energi radiasi pada daerah sinar tampak (Warono, dkk., 2013). Kuvet harus terbuat dari bahan yang tidak menyerap energi radiasi pada daerah yang digunakan. Fotosel berfungsi untuk menangkap cahaya yang diteruskan dan mengubahnya menjadi energi listrik yang kemudian disampaikan oleh detector.

3.8 Bakteri *Klebsiella pneumoniae*

Bakteri *Klebsiella pneumoniae* merupakan salah satu bakteri patogen yang menyebabkan infeksi pada manusia. Bakteri *Klebsiella pneumoniae* dapat ditemukan pada lapisan mukosa mamalia, terutama paru-paru, serta memiliki penyebaran yang cepat dengan gejala awal pendarahan serta penebalan lapisan mukosa organ (Elfidasari, dkk., 2013). Bakteri ini dapat menyebabkan infeksi pada saluran kemih, pernapasan bawah, infeksi aliran darah dan terjadinya bacteremia pada manusia yang memiliki daya tahan tubuh yang rendah. Morfologi bakteri *Klebsiella pneumoniae* ditampilkan pada Gambar 8.



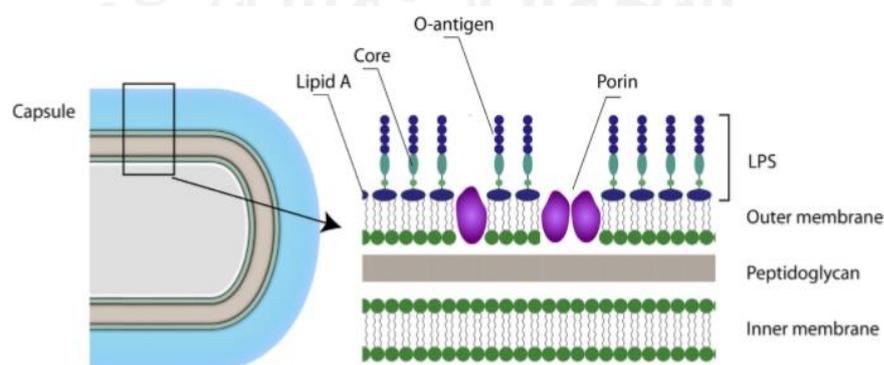
Gambar 8. Morfologi bakteri *Klebsiella pneumoniae*

(Sumber: Elfidasari, dkk., 2013)

Berikut adalah klasifikasi dari bakteri *Klebsiella pneumoniae* (Ghazlina, 2019).

Dominan : Bacteria
 Phylum : Proteobacteria
 Class : Gammaproteobacteria
 Ordo : Enterobacteriales
 Family : Enterobacteriaceae
 Genus : *Klebsiella*
 Species : *Klebsiella pneumoniae*

Bakteri *Klebsiella pneumoniae* merupakan bakteri gram negatif berbentuk batang pendek, memiliki ukuran 2,0-3,0 μm , memiliki kapsul tetapi tidak memiliki spora, dan tidak berflagela. Berdasarkan kebutuhan oksigen *Klebsiella pneumoniae* termasuk bakteri fakultatif anaerob. Selain itu memiliki pertumbuhan pada mucoid, dan tidak motil (Tarina, dkk., 2017). Dinding sel bakteri gram negatif memiliki susunan yang lebih rumit, tersusun atas lapisan terluar berupa lipoprotein, lapisan tengah berupa fosfolipid, dan lapisan dalam berupa lipopolisakarida (Chamidah, dkk., 2019). Telah dilaporkan Tsai, dkk., (2011) bahwa protein membran terluar *Klebsiella pneumoniae* terdiri dari 3 porin yaitu OmpK35, OmpK36, dan OmpK 37. Porin OmpK35 dan OmpK36 berperan penting dalam penetrasi antibiotik ke dalam sel. Penyusun dinding sel bakteri *Klebsiella pneumoniae* ditampilkan pada Gambar 9.



Gambar 9. Penyusun dinding sel bakteri *Klebsiella pneumoniae*

(Sumber: Doorduyn, dkk., 2016)

Klebsiella pneumoniae merupakan bakteri patogen *Multidrug Resistance* (MDR). MDR *Klebsiella pneumoniae* merupakan resistensi bakteri terhadap minimal satu dari tiga lebih dari golongan antibiotik (Khasanah, dkk., 2019).. bakteri yang menghasilkan Enzim *Extended Spectrum Beta Lactamase* (ESBL). Enzim ESBL dapat merusak cincin *Beta Lactam* dari antibiotik dan menimbulkan resistensi antibiotik (Lubis, dkk., 2016). Resistensi dapat terjadi ketika bakteri mengubah struktur binding protein menghasilkan enzim metallo-beta-laktamase yang mengubah permeabilitas membran bakteri akibat hilangnya spesifitas outer membran porin (Afifah, dkk., 2017).

Selain itu resistensi terjadi akibat adanya gen resisten. Gen resisten bakteri dihasilkan melalui mutasi DNA yang terjadi pada plasmid. Plasmid bereplikasi dalam sel inang dan di transfer ke sel bakteri yang lain. Gen resistensi dapat melakukan coding protein transport membran untuk mencegah antibiotik memasuki sel bakteri atau melakukan pemompaan untuk mengeluarkan antibiotik saat memasuki sel bakteri sehingga mencegah kontak dengan target. Pemompaan antibiotik dari sitoplasma menyebabkan konsentrasi senyawa antibiotik terlalu rendah sehingga menjadi tidak efektif (Pratiwi., 2017).

3.8.1 Uji Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri secara *in vitro* dapat dilakukan dengan metode difusi dan metode dilusi. Metode difusi (*Diffusion Test*) berfungsi menentukan daya hambat dari bahan antibakteri. Uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi dapat dilakukan dengan metode disk, dan sumuran. Metode sumuran dilakukan dengan membuat lubang pada media padat yang telah diinokulasi dengan bakteri. Jumlah lubang disesuaikan dengan penelitian, dimana setiap lubang dimasukkan senyawa uji (Retnaningsih, dkk., 2019). Kelebihan metode sumuran adalah kemudahan dalam pengukuran zona hambat karena isolat bakteri tidak hanya dipermukaan tetapi sampai ke dasar media. Kelebihan metode disk adalah dapat dilakukan pengujian lebih banyak dalam satu kali uji, tidak merusak media dan tidak perlu tenaga yang lebih banyak. Kekurangan dari kedua metode ini tidak diketahui secara pasti penghambatan bakterisid atau bakteristatik. Hal ini dipengaruhi oleh factor-

faktor seperti ketebalan media, macam media, inokulum, laju difusi bahan antibakteri (Haryati, dkk., 2017).

Metode dilusi (*Dillution Test*) berfungsi mengetahui MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) yang merupakan konsentrasi terendah suatu bahan antibakteri dapat menghambat pertumbuhan dan MBC (*Minimum Bactericidal Concentration*) merupakan konsentrasi terendah bahan antibakteri dapat membunuh bakteri (Rinawati., 2011). Uji aktivitas dengan metode dilusi dapat dilakukan dengan *broth dilution* dan *solid dilution*. perbedaan dari metode dilusi dan difusi terletak pada metode ujinya dimana metode difusi menggunakan medium padat dan metode dilusi menggunakan medium cair.

Menurut Davis dan Stout., (1971) dalam Fitriah, dkk., (2017) daya hambat dikelompokkan menjadi 4 yaitu sangat kuat bila zona hambat > 20 mm, kuat 10-20 mm, sedang 5-10 mm, dan lemah <5 mm. Faktor-faktor yang mempengaruhi ukuran daerah penghambatan adalah sensitivitas mikroorganisme, medium kultur, kondisi inkubasi, dan kecepatan difusi agar. Faktor-faktor yang mempengaruhi kecepatan difusi agar adalah konsentrasi mikroorganisme, komposisi media, suhu inkubasi dan waktu inkubasi (Schlegel dan Schmidt., 1994) dalam (Siregar, dkk., 2012).

3.8.2 Antibiotik

Antibiotik berdasarkan penghambatannya terbagi menjadi dua tipe, yaitu antibiotik bakteriostatik dan antibiotik bakteriosidal. Antibiotik bakteriostatik memiliki aktivitas menghambat perkembangan, sedangkan antibiotik bakteriosidal memiliki aktivitas membunuh bakteri dengan menghambat pembentukan dinding sel bakteri dan bersifat racun bagi sel (Pratiwi., 2017). Berdasarkan mekanisme kerjanya antibiotik dikelompokkan sebagai berikut: Stringer., (2006) dalam Pratiwi., (2017).

- a. menghambat sintesis dinding sel bakteri dengan cara memecah enzim dinding sel dan menghambat enzim dalam dinding sel. Antibiotik yang termasuk dalam golongan ini adalah golongan beta-laktam seperti, penisilin, sefalosporin, karapenem, vancomysin, dll.

- b. Menghambat sintesis protein dengan cara mengganggu sintesis protein tanpa mengganggu selsel normal. Antibiotik yang termasuk dalam golongan ini antara lain tetrasiklin, streptogamin, kloramfenikol, dll.
- c. Mengubah permeabilitas membran dengan cara menghilangkan substansi seluler sehingga sel menjadi lisis. Antibiotik yang termasuk golongan ini adalah polimiksin, nystatin, kolistin, dll.

Dalam penelitian ini digunakan antibiotik ampisilin dan eritromisin sebagai control positif dalam uji antibakteri. Eritromisin merupakan antibiotik golongan makrolid yang memiliki cincin lakton dalam rumus molekulnya. Eritromisin memiliki mekanisme penghambatan dengan menghambat sintesis protein melalui pengikatan reversible pada ribosom sub unit 50S dan tempat ikatannya pada 23S rRNA. Menurut Setiabudy (2007) eritromisin akan menghambat translokasi kompleks t-RNA-peptida dari asam amino ke peptida. Akibatnya, rantai polipeptida tidak dapat diperpanjang karena asam amino tidak dapat menerima kompleks tRNA-asam amino yang baru. Eritromisin bersifat bakteriostatik, dan terkadang bersifat bakterisidal untuk bakteri yang sangat sensitif. Baharutan, dkk., (2015) melakukan uji kepekaan bakteri yang diisolasi dari sputum pasien penderita bronkitis terhadap antibiotik ampisilin, eritromisin, dan ciprofloxacin hasil isolasi bakteri dari sputum diperoleh bakteri *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Bacillus sp*, *Bacteroides gracilis*, dan *Klebsiella pneumoniae*. Uji kepekaan eritromisin menunjukkan penghambatan yang intermediet sebesar 62,5% untuk bakteri *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Bacillus sp*, dan *Klebsiella pneumoniae*. Kepekaan intermediet merupakan hasil kepekaan antibiotik yang menunjukkan zona tengah antara sensitif dan resisten terhadap antibiotik, serta dapat digunakan dengan meningkatkan dosis terapi.

Ampisilin merupakan antibiotik golongan penisilin yang memiliki spectrum luas, dan tahan asam tetapi tidak tahan terhadap enzim penisilinase. Ampisilin memiliki mekanisme aksi penghambat sintesis dinding sel bakteri dengan mengikat satu atau lebih ikatan penisilin-protein, sehingga menghambat tahap akhir transpeptidase sintesis peptidoglikan. Akibat penghambatan ini biosintesis dinding sel bakteri terhambat dan sel menjadi lisis (Kurniawati., 2015).

Baharutan, dkk., (2015) melakukan uji kepekaan bakteri yang diisolasi dari sputum pasien penderita bronkitis terhadap antibiotik ampicillin, eritromisin, dan ciprofloxacin hasil idolasi bakteri dari sputum diperoleh bakteri *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Bacillus sp*, *Bacteroides gracilis*, dan *Klebsiella pneumoniae*. Hasil uji kepekaan antibiotik ampicillin menunjukkan hasil resisten. Mekanisme resistensi antibiotik ampicillin terhadap bakteri gram negatif dan gram positif dengan dengan menghasilkan enzim beta-laktamase. Enzim beta-laktamase merupakan enzim yang dapat membuka cincin betalaktam dari antibiotik. Bakteri *Klebsiella pneumoniae* mengandung plasmid dengan gen *extended spectrum beta-lactamase* (ESBL). Enzim yang beta-laktamase yang dihasilkan bakteri *Klebsiella pneumoniae* menyebabkan resistensinya terhadap ampicillin (Baharudin, dkk., 2015).

3.9 Inhalasi

Inhalasi adalah proses pengobatan dengan cara menghirup obat agar obat langsung dapat masuk menuju paru-paru sebagai organ sasaran. Inhalasi memiliki tiga sistem penghantaran obat yaitu Nebulizer, MDI (*Metered Dose Inhaler*), dan DPI (*Dry Powder Inhaler*). Proses penghantaran ini didasarkan pada mekanisme deposisi partikel pada saluran pernapasan yang terdiri dari inersial, sedimentasi, dan difusi gerak brown (Hutauru dan Anggraeni., 2016).

1. Nebulizer

Nebulizer adalah penghantaran obat dengan melarutkan atau disuspensikan ke dalam pelarut menjadi bentuk gas atau aerosol. Aerosol adalah disperse suatu obat berupa cairan atau zat padat dalam suatu gas. Nebulizer ditujukan untuk anak-anak dan lansia yang kesulitan menggunakan MDI dan DPI (Rohmatillah., 2015).

2. MDI (*Metered Dose Inhaler*)

Metered Dose Inhaler (MDI) adalah penghantaran dengan dosis terukur yang disemprotkan dalam bentuk gas ke dalam mulut dan dihirup. MDI mengasilkan kabut halus dari obat dengan ukuran $< 5\mu$. MDI menggunakan propelan saat penyemprotan dan menggunakan *spacer*. Penggunaan MDI memiliki teknik khusus dimana diperlukan koordinasi antara tangan yang menekan alat MDI dengan organ

yang menghirup obat. Cara penggunaan yang salah dapat mempengaruhi hasil klinis terapi (Rohmatillah., 2015).

3. DPI (*Dry Powder Inhaler*)

Dry Powder Inhaler (DPI) merupakan inhaler serbuk kering yang dihantarkan secara local melalui paru-paru. Inhaler jenis ini tidak mengandung propelan sehingga bersifat lebih ramah lingkungan. DPI diperlukan hirupan yang cukup kuat agar obat dapat masuk kedalam saluran pernapasan, bergantung pada teknik dan kemampuan pasien dalam menghirup udara (Rohmatillah., 2015).



BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain tabung reaksi (*iwaki*), gelas Beaker 250 ml (*pyrex*), gelas Beaker 100 ml (*pyrex*), gelas Beaker 50 ml (*pyrex*), neraca analitik (*Ohaus*), *rotary vacuum evaporator* (*Buchni R-200*), *Hotplate magnetic stirrer* (*Cimarec*), spatula, pipet ukur 10 ml (*Iwaki*), propipet, kompor pemanas, bunsen, gelas ukur 100 ml (*Iwaki*), *Laminar Air Flow* (*ESCO*), lemari es (*Samsung RT22FARBDSA*), pengaduk gelas batang, pipet tetes, spatula, oven (*Memmert*), autoklaf (*Hirayama Hiclave hve-50*), incubator (*Memmert*), jarum ose, pinset, standar Mc Farlan 10^8 CFU, vortex (*Heidolph*), cawan petri (*Labware-Charuzu*), corong gelas, rak tabung reaksi, seperangkat alat spektrofotometer Uv-Vis (*UH5300*), seperangkat alat *particle size analyzer* (*HORIBA SZ-100*), seperangkat alat *colony counter* (*SCAN 500*), *ultrasonik homogenizer* (*300 V/T*).

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu lengkuas merah, ethanol 96% teknis, kertas saring, asam klorida pekat (*Merck*), akuades, natrium tripolyphosphate teknis, reagen Dragendroff, reagen Libermann-Burchard, serbuk Mg, FeCl₃, kloroform (*Merck*), asam tanat, natrium karbonat (*Merck*), reagen folin, asam asetat (*Merck*), kitosan, *plastic wrap* (*Bagus*), media Mueller-Hinton Agar (*OXOID*), kapas, paper disk (*OXOID*), antibiotik eritromisin (*OXOID*), antibiotik ampicillin (*OXOID*), *cotton swab steril* (*ONEMED*), natrium klorida steril, pH universal.

4.2 Sampel dan Teknik Pengambilan

Sampel lengkuas merah yang digunakan didapatkan dari Pasar Bringharjo Yogyakarta, dan diidentifikasi di Laboratorium Biofarma Universitas Gajah Mada. Sampel lengkuas merah yang digunakan dalam penelitian adalah bagian rimpang.

4.3 Cara Kerja Penelitian

4.3.1 Pembuatan Bubuk Simplisia

Lengkuas merah segar dicuci bersih kemudian dipotong-potong kecil. Selanjutnya dioven pada suhu 35 °C berfungsi untuk menguapkan air dan

kelembapan. Selanjutnya dihaluskan dengan blender untuk memperbesar luas permukaan.

4.3.2 Ekstraksi Lengkuas Merah

Ekstrak lengkuas merah dibuat dengan variasi volume pelarut dan waktu maserasi. Variasi volume pelarut dilakukan dengan menimbang 100 g serbuk lengkuas merah ditambahkan dengan pelarut etanol 96% dengan variasi volume etanol sebanyak 400 mL, 500 mL, 600 mL, 700 mL, 800 ml, dan 900 ml selama 24 jam dengan disertai pengadukan dengan *rotary shaker* dengan kecepatan putaran 190 rpm. Variasi waktu maserasi dilakukan dengan menimbang 100 g serbuk lengkuas merah ditambahkan etanol 96% sebanyak 600 mL, dan dilakukan maserasi selama 6 jam, 12 jam, 18 jam, 24 dan 30 jam dengan disertai pengadukan *rotary shaker* dengan kecepatan putaran 190 rpm. Hasil maserasi disaring menggunakan kertas saring sampai didapatkan ekstrak cair yang bebas ampas. Ekstrak cair dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 80 °C dan ditimbang ekstrak kental sampai beratnya konstan. Ekstrak yang dihasilkan dicampurkan untuk uji kualitatif dan kuantitatif. Kemudian dihitung % rendemen produk dengan rumus:

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat akhir sampel (g)}}{\text{Berat awal sampel (g)}} \times 100\%$$

4.3.3 Sintesis nanoemulsi ekstrak lengkuas merah

Sebanyak 0,1 g kitosan ditimbang dan dilarutkan kedalam 100 mL asam asetat 1% kemudian dihomogenkan dengan pengaduk magnet pada suhu ruang selama semalam. Larutan kitosan disaring dengan kertas saring untuk menghilangkan sisa partikel kitosan yang tidak larut. Larutan NaTPP 0,1% dibuat dengan menimbang 0,1 g NaTPP dilarutkan dalam 100 mL akuadest. Larutan NaTPP disaring dengan kertas saring untuk menghilangkan sisa partikel yang tidak larut. Larutan stok ekstrak dibuat dengan konsentrasi 12,5%. Larutan ekstrak ditambahkan ke dalam larutan NaTPP secara tetes demi tetes sambil dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer* selama 1 jam. Larutan TPP/Ekstrak ditambahkan ke dalam larutan kitosan 0,1% tetes demi tetes sehingga terbentuk suspensi

nanoemulsi. Pengadukan terus dilanjutkan menggunakan *magnetic stirrer* selama 1 jam agar *crosslinking* berlangsung sempurna. Selanjutnya proses sonikasi dilakukan untuk menghomogenkan campuran selama 10 menit.

4.3.4 Karakterisasi Nanoemulsi

Karakterisasi nanoemulsi dilakukan untuk mengetahui karakter nanoemulsi yang dihasilkan. Karakterisasi nanoemulsi dilakukan dengan instrumentasi *particle size analyzer* dengan teknik *Dynamic light scattering* (DLS). Parameter yang dianalisis meliputi diameter partikel rerata (Z_{Ave}), dan indeks polidispersitas (PI).

4.3.5 Uji Stabilitas Nanoemulsi

Uji stabilitas nanoemulsi dilakukan dengan menyimpan nanoemulsi ekstrak lengkuas merah dalam wadah tertutup kemudian diletakkan pada 2 variasi suhu, yaitu 6, dan 30 °C. Pengujian stabilitas nanoemulsi dilakukan pada dengan rentang waktu 0, 1, 2, 3, 4 minggu dengan parameter pengamatan fisik berupa homogenitas, bau, dan pH.

4.3.6 Uji antibakteri nanoemulsi lengkuas merah

1. Sterilisasi alat

Sterilisasi alat dilakukan sebelum semua alat digunakan, yaitu dengan cara membungkus semua alat dengan aluminium foil kemudian dimasukkan kedalam autoklaf dengan suhu 121 °C selama 2 jam.

2. Pembuatan media dasar

Media Mueller-Hinton Agar (MHA) ditimbang sebanyak 7,6 g dilarutkan dalam 200 mL akuadest panas dalam Erlenmeyer dan dihomogenkan. Media yang sudah homogen disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 2 jam. Selanjutnya dituangkan dalam cawan petri di dalam *laminar air flow* dan dibiarkan memadat.

3. Regenerasi bakteri

Media miring disiapkan dalam tabung reaksi. Biakan bakteri digoreskan ke media agar miring. Kultur bakteri pada masing-masing media agar miring dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam didalam inkubator.

4. Suspensibakteri

Suspensi bakteri dilakukan dengan uji yang telah di regenerasikan, diambil satu ose kemudian disuspensikan ke dalam tabung reaksi yang berisi 5 ml larutan NaCl steril 0,9%. Suspensi yang terbentuk samakan kekeruhannya dengan larutan standar Mc Farland 0.5 yaitu $1,5 \times 10^8$ CFU/mL.

5. Pembuatan larutan kontrol positif dan kontrol negatif

Kontrol positif digunakan adalah antibiotik eritromisin dan ampisilin dalam bentuk strip. Kontrol negatif yang digunakan adalah larutan kitosan 0,1% dan larutan matriks penyalut. Larutan penyalut dibuat dengan cara memipet 5 ml larutan kitosan 0,1% dan ditambahkan larutan NaTPP 0,1% secara tetes demi tetes kemudian, dihomogenkan menggunakan magnetic stirrer selama 2 jam.

6. Uji efektivitas

Media MHA yang telah padat dioleskan suspensi bakteri menggunakan *cotton swab* steril diseluruh permukaan media. Kertas cakram ukuran 6 mm direndam di dalam larutan uji dan diletakkan diatas media menggunakan pinset steril. Selanjutnya semua cawan petri diinkubasi dalam incubator pada suhu 37 °C selama 24 jam.

7. Pengukuran dan penetapan zona hambat

Pengamatan dilakukan setelah 1 x 24 jam masa inkubasi. Zona bening merupakan kepekaan mikroba terhadap bahan antimikroba yang digunakan sebagai bahan uji yang dinyatakan dengan lebar diameter zona hambat. Diameter zona hambat diukur dengan jangka sorong, kemudian dikategorikan zona hambatnya berdasarkan kekuatan daya antibakteri.

4.3.7 Skrining Fitokimia

1. Uji Alkaloid

Identifikasi senyawa alkaloid menggunakan pereaksi Dragendroff. Sebanyak 0,1 g ekstrak dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan 2 ml akuades. Kemudian ditambahkan HCL 2 N sebanyak 2 ml dan dipanaskan selama 5 menit. Disaring dan filtrate yang diperoleh ditambahkan 3 tetes pereaksi

Dragendroff. Adanya senyawa alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna jingga atau oranye.

2. Uji Flavonoid

Sebanyak 0,1 g ekstrak dimasukkan dalam tabung reaksi dan dilarutkan dengan 2 ml etanol. Selanjutnya ditambahkan serbuk Mg dan HCl pekat sebanyak 5 tetes. Adanya senyawa flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah atau jingga.

3. Uji Saponin

Sebanyak 0,1 g ekstrak lengkuas merah ditambahkan dengan 5 mL aquades panas lalu didinginkan. Setelah itu campuran dikocok sampai muncul buih dan didiamkan selama 2 menit. Selanjutnya campuran ditambahkan dengan 2 tetes HCl 2 N dan dikocok lagi sampai terbentuk buih yang mantap selama 10 menit. Terbentuknya buih tersebut sebagai indikator reaksi positif adanya saponin.

4. Uji Tannin

Sebanyak 0,1 g ekstrak lengkuas merah ditambahkan dengan 5 mL etanol absolut kemudian ditambahkan 3-4 tetes dengan FeCl_3 1%. Jika terbentuk warna biru kehitaman menunjukkan reaksi positif adanya tannin.

5. Uji Steroid

Identifikasi steroid dilakukan dengan penambahan pereaksi Libermann-Burchard. Sebanyak 0,1 g ekstrak lengkuas merah dilarutkan dalam 2 ml kloroform. Kemudian ditambahkan 3-4 tetes reagen Libermann-Burchard. Adanya senyawa steroid ditandai dengan terbentuknya warna hujau kehitaman.

4.3.8 Uji Kuantitatif Kadar Tannin Ekstrak Lengkuas Merah

1. Pembuatan larutan standar asam tanat

Sebanyak 0,01 g asam tanat ditimbang dan dilarutkan dengan akuades dalam gelas beker. Selanjutnya dimasukkan dalam labu ukur 100 ml dan ditambahkan akuades sampai tanda batas. Dihasilkan larutan asam tanat 100 ppm. Selanjutnya larutan standar 100 ppm dijadikan sebagai larutan standar dengan konsentrasi 20, 40, 60, dan 80 ppm.

2. Pembuatan larutan Na_2CO_3 jenuh

Pembuatan larutan Na_2CO_3 jenuh dilakukan dengan cara menimbang sebanyak 3,5 g Na_2CO_3 . Kemudian, dilarutkan dengan akuades 10 ml dalam gelas Beaker. Larutan dihomogenkan dengan pengadukan.

3. Pembuatan larutan ekstrak

Sebanyak 0,1 g ekstrak lengkuas merah ditimbang dan ditambahkan akuades dalam gelas Beaker. Campuran dihomogenkan dengan *magnetic stirrer* dengan pemanasan. Campuran disaring dan dimasukkan dalam labu ukur 100 ml. Akuades ditambahkan sampai tanda batas. 10 ml larutan ekstrak dipipet kemudian dimasukkan dalam labu ukur 100 ml dan ditera dengan akuadest sampai tanda batas.

4. Pembuatan larutan uji

Sebanyak 10 buah tabung reaksi disiapkan dan diberi label. 0,5 ml larutan standar 20, 40, 60, 80, dan 100 ppm dipipet kemudian dimasukkan tabung reaksi. Sebanyak 0,5 ml larutan ekstrak dipipet dan dimasukkan dalam tabung reaksi. 7,5 ml akuadest dipipet kedalam masing-masing tabung reaksi. 0,5 ml larutan Na_2CO_3 jenuh dan 0,5 ml reagen folin ditambahkan ke dalam setiap tabung reaksi. Larutan blanko dibuat dengan 8 ml akuadest kemudian ditambahkan 0,5 ml larutan Na_2CO_3 jenuh dan 0,5 ml pereaksi folin. Campuran dihomogenkan dan dilakukan inkubasi di tempat yang tidak terkena cahaya selama 30 menit. Selanjutnya, pengukuran dilakukan dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 700 nm. Hasil pembacaan absorbansi yang diperoleh digunakan untuk pembuatan kurva kalibrasi terhadap konsentrasi dan dihitung kadar tannin total dalam sampel.

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas nanoemulsi ekstrak lengkuas merah dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Klebsiella pneumoniae*. Penelitian ini diawali dengan melakukan determinasi tanaman, maserasi dengan variasi waktu dan perbandingan volume pelarut untuk mendapatkan rendemen optimum, dilanjutkan dengan identifikasi senyawa aktif yang terdapat dalam ekstrak lengkuas merah, sintesis dan karakterisasi nanoemulsi, uji stabilitas nanoemulsi, dan uji aktivitas nanoemulsi ekstrak lengkuas merah sebagai antibakteri *Klebsiella pneumoniae*.

5.1 Determinasi tanaman

Tanaman lengkuas merah yang dalam penelitian ini dideterminasi di laboratorium Biologi Farmasi Universitas Gadjah Mada. Determinasi tanaman bertujuan untuk mencocokkan ciri-ciri morfologi yang ada pada tanaman yang akan diteliti sehingga tidak terjadi kesalahan sampel tanaman untuk penelitian. Hasil determinasi menyatakan bahwa tanaman tersebut adalah tanaman lengkuas merah dengan nama latin *Alpinia purpurata* (Vieill) K. Schum dan suku Zingiberaceae. Hasil determinasi tanaman dicantumkan dalam Lampiran 2.

5.2 Pembuatan Simplisia

Rimpang lengkuas merah segar yang didapatkan dicuci dan dikeringkan untuk menghilangkan pengotor. Proses pengeringan dilakukan dengan mengoven simplisia pada suhu 35 °C selama 48 jam. Proses ini berfungsi untuk mengurangi kadar air dalam sampel agar dapat disimpan dalam waktu yang lama dan menghentikan reaksi enzimatik sehingga simplisia tidak mudah berjamur. Pengeringan simplisia dapat meningkatkan kemampuan penarikan senyawa metabolit sekunder, dimana pada simplisia segar dinding selnya masih utuh sehingga metabolit sekunder sulit melewati dinding sel sehingga proses ekstraksi tidak berjalan optimal (Luliana, dkk., 2016). Proses selanjutnya yaitu penghalusan simplisia yang bertujuan untuk meningkatkan luas permukaan simplisia sehingga kontak antara simplisia dengan pelarut semakin besar, penetrasi pelarut dalam membran sel semakin besar, dan meningkatkan proses ekstraksi.

5.3 Ekstraksi Lengkuas Merah

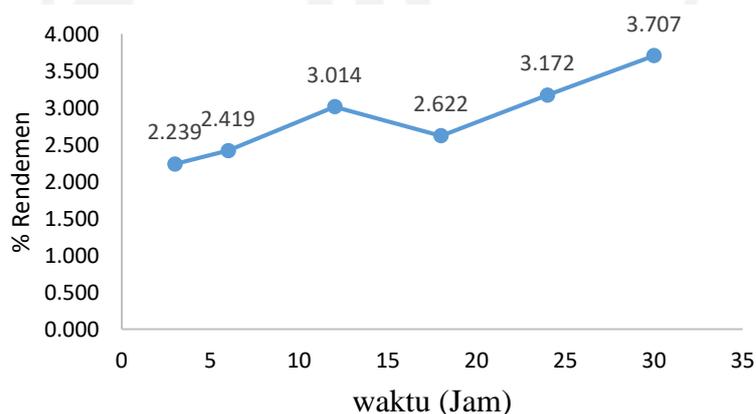
Ekstraksi adalah proses pemisahan komponen senyawa berdasarkan kelarutannya. Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode maserasi karena relatif aman untuk bahan dan senyawa yang tidak tahan terhadap pemanasan. Maserasi dilakukan dengan merendam simplisia dalam pelarut. Pada proses perendaman simplisia akan mengalami pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan didalam dan diluar sel, sehingga metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut. Pelarut yang mengalir kedalam sel akan menyebabkan protoplasma membengkak dan bahan kandungan sel akan larut sesuai kelarutannya (Yulianingtyas, dkk., 2016). Pelarut yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol 96%. Etanol dipilih sebagai pelarut karena bersifat universal sehingga dapat mengekstrak lebih banyak zat aktif, tidak beracun, dapat mencegah pertumbuhan kapang, kuman, dan suhu yang digunakan untuk pemekatan lebih rendah. Etanol memiliki gugus polar (-OH) dan gugus non-polar (C₂H₅) sehingga dapat melarutkan senyawa polar dan non-polar. Etanol merupakan pelarut organik yang bersifat polar dengan konstanta dielektrik bernilai 24 (Verdiana, dkk., 2018).

Maserasi dilakukan dengan pengadukan menggunakan *rotary shaker* pada kecepatan 190 rpm. Pengadukan bertujuan untuk mempercepat kontak antara simplisia dengan pelarut dan mempercepat kesetimbangan konsentrasi zat aktif kedalam pelarut. Pengadukan akan meningkatkan penarikan zat terlarut dari permukaan padatan ke pelarut (Ariyani, dkk., 2008). Warna larutan yang dihasilkan setelah proses maserasi adalah oranye pekat, yang menandakan proses maserasi telah berlangsung. Maserasi yang dihasilkan disaring menggunakan kertas saring untuk memisahkan residu padatnya. Filtrat yang dihasilkan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 80 °C dan putaran 90 rpm. Filtrat dipekatkan untuk menguapkan pelarut sehingga didapatkan ekstrak kental. *Rotary evaporator* bekerja berdasarkan penguapan pelarut dengan memanaskan ekstrak di bawah titik didihnya dan kondisi vakum yang menyebabkan proses penguapan semakin cepat (Amaliah, dkk., 2019).

Hasil dari proses maserasi mendapatkan ekstrak kental dengan karakteristik berwarna coklat pekat, dan bau lengkuas yang tajam. Ekstrak kental yang dihasilkan masing masing ditimbang dan dihitung nilai rendemennya. Simanjuntak, dkk., (2018) melaporkan ekstraksi rimpang lengkuas merah dengan pelarut etanol 96% selama 5 hari mendapatkan ekstrak kental sebanyak 36,3 g. Kondisi maserasi sangat berpengaruh terhadap rendemen yang dihasilkan, oleh karena itu lama waktu kontak dan rasio volume pelarut diamati dalam sub bab 5.3.1 dan 5.3.2. Data yang didapat merupakan data pengulangan sebanyak 3 kali dan untuk melihat adanya perbedaan rata-rata setiap perlakuan dilakukan uji *ANOVA one-way*. Sebelum dilakukan uji *ANOVA one way* dilakukan uji normalitas dan uji homogenitas sebagai syarat dilakukannya uji *ANOVA*. Uji homogenitas dan normalitas berfungsi untuk mengetahui data yang diperoleh telah terdistribusi normal dan homogen. Uji normalitas menggunakan uji *Shapiro-wilk* dan homogenitas menggunakan uji *Lavene* pada tingkat kepercayaan 95% menunjukkan nilai sig $>0,05$ yang berarti data terdistribusi normal dan homogen.

5.3.1 Pengaruh variasi waktu kontak terhadap rendemen maserasi

Waktu maserasi akan mempengaruhi rendemen yang dihasilkan. Gambar 10 menunjukkan pengaruh waktu ekstraksi terhadap rendemen yang dihasilkan.



Gambar 10. Grafik hubungan antara rendemen dengan waktu maserasi

Gambar 10 menunjukkan bahwa nilai rata-rata rendemen maserasi dengan perlakuan perbandingan waktu tertinggi diperoleh waktu maserasi 30 jam yaitu 3,707%. Rendemen terendah diperoleh dari waktu maserasi 3 jam yaitu 2,239%,

hal ini disebabkan waktu maserasi yang terlalu singkat mengakibatkan tidak semua zat aktif terlarut dalam pelarut yang digunakan. Penambahan waktu maserasi meningkatkan hasil rendemen karena semakin lama waktu ekstraksi memberikan waktu yang cukup bagi pelarut untuk menembus dinding sel dan menarik keluar senyawa-senyawa yang terkandung dalam simplisia. Kondisi ini akan terus berlanjut hingga tercapai kesetimbangan konsentrasi senyawa dalam simplisia dengan konsentrasi senyawa pada pelarut.

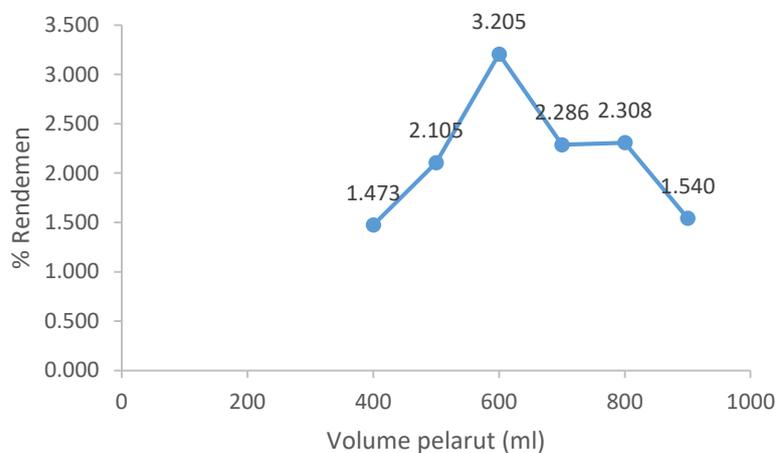
Penurunan hasil rendemen terjadi pada waktu ekstraksi 18 jam dengan hasil rendemen sebesar 2,622%. Proses ekstraksi dibedakan menjadi dua fase yaitu fase pencucian (*Washing time*) dan fase ekstraksi (*Difusi*). Fase *washing time* merupakan waktu yang dibutuhkan oleh pelarut untuk menarik senyawa yang terdapat diluar sel akibat pecahnya dinding sel saat proses pengecilan ukuran yang menyebabkan senyawa yang ada dalamnya keluar sel. Fase difusi merupakan waktu pelarut menarik senyawa senyawa yang ada didalam sel karena adanya perbedaan konsentrasi larutan di dalam sel dan pelarut diluar sel (Pratiwi., 2010). Pada proses ekstraksi pelarut masuk ke dalam sel simplisia dan membawa zat aktif keluar sel yang menyebabkan kekosongan rongga sel. Penurunan hasil rendemen pada waktu ekstraksi 18 jam terjadi akibat adanya interaksi zat terlarut dengan material tanaman lain yang tidak terlarut dan mengakibatkan zat aktif kembali menempel pada permukaan simplisia sehingga presentase rendemen menurun (Sari, dkk., 2017).

Analisis uji statistic ANOVA (*Analysis of Variance*) satu arah dengan derajat kepercayaan 95% (0,05) digunakan untuk melihat nilai perbandingan rata-rata rendemen pada variasi waktu ekstraksi. Hasil analisis menunjukkan adanya pengaruh nyata rendemen dengan variasi waktu $\text{sig} < 0,05$ ($F = 1.499E3$, $p = 0,00$) antara hasil rendemen antar variasi waktu. Waktu maserasi yang semakin lama menyebabkan pelarut dapat menembus dinding sel simplisia sehingga kerusakan jaringan simplisia akan semakin optimal dan senyawa metabolit akan terlarut lebih banyak.

5.3.2 Pengaruh variasi volume pelarut terhadap rendemen maserasi

Distribusi pelarut ke padatan akan berpengaruh pada perolehan rendemen ekstrak lengkuas merah. Perbandingan antara pelarut dan padatan mempengaruhi

rendemen yang dihasilkan. Gambar 11 menunjukkan pengaruh penambahan volume pelarut terhadap rendemen yang dihasilkan.



Gambar 11. Grafik hubungan antara rendemen dengan variasi volume pelarut.

Gambar 11 menunjukkan nilai rata-rata rendemen ekstrak dengan perlakuan perbandingan volume pelarut dihasilkan rendemen terendah sebesar 1,473% dari pelarut 400 ml. Rendemen tertinggi dihasilkan dari pelarut 600 ml dengan rendemen sebesar 3,205%. Penambahan volume pelarut dapat meningkatkan rendemen maserasi hingga volume pelarut 600 ml. Penambahan pelarut mempengaruhi luas kontak simplisia dengan pelarut, semakin banyak pelarut luas kontak akan semakin besar, yang menyebabkan distribusi pelarut ke simplisia akan semakin besar. Distribusi pelarut yang merata akan memperbesar rendemen yang dihasilkan. Pelarut yang semakin banyak akan mengurangi tingkat kejenuhan pelarut, sehingga senyawa metabolit akan terekstrak secara sempurna (Jayanudin, dkk., 2014). Proses penyarian akan terus berlangsung sampai terjadi kesetimbangan konsentrasi. Zat aktif akan terlarut karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel dan diluar sel, sehingga larutan yang memiliki konsentrasi lebih tinggi akan terdesak keluar (Dwicahyani, dkk., 2018). Penambahan pelarut dapat menambah difusivitas pelarut ke dalam sel dan meningkatkan desorpsi senyawa aktif dalam sel (Yulianingtyas dan Bambang., 2016).

Penambahan jumlah pelarut lebih dari 600 ml tidak lagi efektif meningkatkan rendemen. Penurunan hasil rendemen disebabkan penambahan volume pelarut yang terlalu besar menyebabkan turbulensi yang semakin kecil sehingga mengurangi penurunan rendemen ekstrak (Yulianingtyas dan Bambang., 2016). Selain itu proses penyaringan dilakukan menggunakan corong gelas sehingga memungkinkan pelarut menguap saat proses penyaringan yang menyebabkan rendemen yang dihasilkan lebih sedikit. Titik optimum ekstraksi tercapai pada volume pelarut 600 ml, sehingga penambahan volume pelarut setelah 600 ml tidak efektif lagi meningkatkan rendemen yang dihasilkan.

Analisis uji statistic ANOVA (*Analysis of Variance*) satu arah dengan derajat kepercayaan 95% (0,05) digunakan untuk melihat nilai perbandingan rata-rata rendemen pada variasi volume pelarut. Hasil analisis menunjukkan adanya pengaruh nyata hasil rendemen dengan variasi volume pelarut $\text{sig} < 0,05$ ($F=775.414$, $p=0,00$) antara hasil rendemen antar variasi waktu. Penambahan volume pelarut meningkatkan rendemen karena banyaknya pelarut yang ditambahkan maka semakin kuat pelarut menembus dinding sel simplisia yang menyebabkan proses ekstraksi semakin optimal.

Lengkuas merah diekstraksi dengan pelarut etanol pada suhu ruang dan pengadukan *rotary shaker* dengan kecepatan 190 rpm. Kondisi optimum maserasi lengkuas merah dicapai pada waktu ekstraksi 30 jam dengan volume pelarut 600 ml. Waktu ekstraksi yang semakin lama menyebabkan semakin banyak zat aktif yang akan terekstrak. Volume pelarut yang ditambahkan semakin banyak menyebabkan semakin kuat pelarut untuk menembus dinding sel dan zat aktif yang terekstrak semakin banyak. Volume pelarut yang ditambahkan akan meningkatkan hasil rendemen hingga titik optimum, setelah titik optimum penambahan volume pelarut tidak efektif meningkatkan hasil rendemen.

5.4 Sintesis Nanoemulsi Ekstrak Lengkuas Merah

Ekstrak herbal sebagai antibakteri dapat ditingkatkan dengan formulasi sediaan nanopartikel. Nanopartikel merupakan partikel dengan ukuran 1 sampai 1000 nm atau dibawah satu mikron. Sediaan nanopartikel dengan ukuran 200-500 nm dapat diterima oleh tubuh untuk meningkatkan efek terapi, mengurangi efek

samping, dan menurunkan dosis terapi karena ukuran partikel yang kecil memiliki kemampuan menembus ruang ruang sel menuju target (Mardiyanto, dkk., 2019).

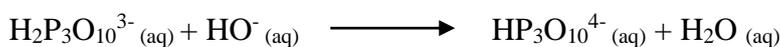
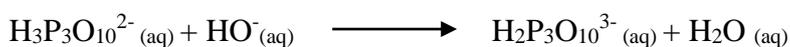
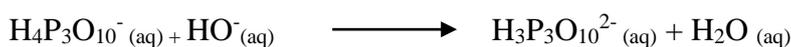
Nanopartikel dapat disintesis secara *top-down* dan *bottom-up*, yang membedakan kedua metode ini ada pada proses sintesisnya. Metode *Top-down* merupakan metode sintesis dimana terjadi pemecahan material besar menjadi material berukuran nanometer. Sedangkan, metode *Bottom-up* sintesis nanopartikel dilakukan dengan membentuk partikel nano dari prekursor molekul pada keadaan gas atau larutan (Prasetyo., 2018). Pada penelitian ini nanoemulsi disintesis dengan metode *Bottom-up*. Metode yang digunakan adalah metode gelasi ionik, dimana surfaktan dan ko-surfaktan akan membentuk ikatan silang karena muatan yang berlawanan. Gugus fosfat dari ionisasi Na-TPP akan berinteraksi dengan gugus amina dari kitosan dengan membentuk ikatan silang intramolekul dan ektramolekul (Shah, dkk., 2016). Semakin banyak terjadi reaksi sambung silang ionik antara kitosan dan Na-TPP, maka semakin banyak molekul nanopartikel zat aktif yang terbentuk. Wahyono., (2010) melaporkan bahwa penambahan TPP yang berinteraksi dengan kitosan membentuk ikatan silang akan menyebabkan nanoemulsi semakin rapat dan memperkuat matriks nanoemulsi, sehingga dihasilkan nanopartikel yang lebih stabil. Faktor yang berpengaruh dalam pembuatan nanoemulsi, yaitu konsentrasi penyalut, pH, dan proses terjadinya taut silang.

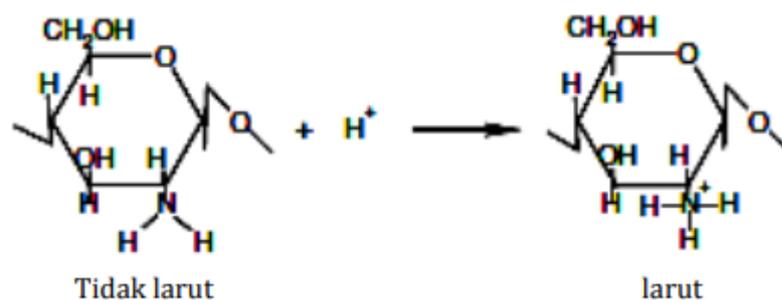
Sebelum dilakukan sintesis nanoemulsi dilakukan studi pendahuluan untuk menentukan rasio yang digunakan dalam preparasi material pembawa. Apabila larutan kitosan memiliki konsentrasi yang tinggi maka interaksi kitosan dengan TPP yang terbentuk akan sangat padat yang menyebabkan partikel yang terbentuk agregat menjadi partikel berukuran besar. Namun, natrium tripolifosfat yang ditambahkan terlalu banyak cenderung mengurangi kelarutan dan meningkatkan ukuran partikel (Husniati dan Eva., 2014). Selain itu, natrium tripolifosfat yang ditambahkan terlalu banyak dapat menyebabkan peningkatan pH. Kitosan larut dalam asam dengan pH dibawah 6. Pada pH tinggi kelarutan kitosan menurun yang menyebabkan terjadi pengendapan (Winarti., 2011). Dilaporkan Mardliyanti, dkk., (2012) untuk mengasilkan nanopartikel dengan karakteristik terbaik menggunakan

metode gelasi ionik dengan rasio matriks 5:1, konsentrasi 0,1% antara kitosan dan TPP.

Dalam penelitian ini nanoemulsi ekstrak lengkuas merah disintesis dalam dua formulasi, yaitu dengan penambahan Na-TPP dan tanpa penambahan Na-TPP. Kitosan berperan sebagai surfaktan dan Na-TPP sebagai ko-surfaktan yang berinteraksi membentuk ikatan silang dan melingkupi inti dimana obat terperangkap. Kitosan merupakan polisakarida alami yang terbentuk dari proses deasetilasi kitin. Kitosan memiliki potensi sebagai sistem pembawa yang menguntungkan karena bersifat *biodegradable*, *biokompatibel*, dan mukoadhesi (Winarti., 2011). Akan tetapi kitosan memiliki derajat *swelling* tinggi yang menyebabkan pelepasan obat menjadi lebih cepat karena itu aplikasi sebagai penghantaran dan pelepasan obatnya menjadi kurang baik (Alauhdin, dkk., 2014). Sistem penghantaran dan pelepasan kitosan perlu diperbaiki dengan menambahkan pengstabil. Natrium tripolifosfat merupakan zat pengstabil yang tidak beracun, harganya murah dan dapat digunakan sebagai aditif makanan. Penambahan Na-TPP diharapkan diharapkan tidak mengurangi kompatibilitas kitosan sebagai sistem penghantaran dan pelepasan obat.

Hal pertama yang dilakukan dalam pembuatan nanoemulsi ekstrak lengkuas merah yaitu melarutkan material penyalut dan zat tersalut. Kitosan merupakan polimer penyalut yang larut dalam asam. Dalam larutan asam gugus amina (NH₂) bebas kitosan akan menerima H⁺ yang dilepaskan asam asetat menjadi bermuatan positif (⁺NH₃). Sedangkan natrium tripolofosfat larut dalam aquadest dan akan terdisosiasi membentuk ion tropolifosfat dan ion hidroksil. Reaksi ionisasi natrium tripolifosfat dalam air adalah sebagai berikut:

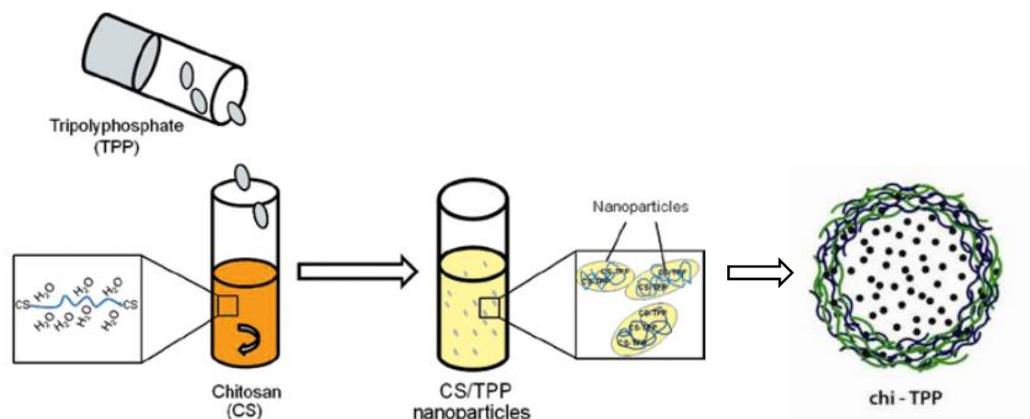




Gambar 12. (a) Reaksi protonasi kitosan

(Sumber: Alauhdin, dkk., 2014)

Zat tersalut yaitu ekstrak lengkuas merah yang dilarutkan dalam aquadest. Selanjutnya larutan ekstrak lengkuas merah ditambahkan secara meneteskan kedalam larutan NaTPP 0,1% dengan pengadukan dan dilanjutkan dengan penambahan larutan NaTPP/Ekstrak dengan meneteskan kedalam larutan kitosan 0,1% dengan pengadukan menggunakan pengaduk magnet. Kecepatan pengadukan merupakan salah satu faktor yang menentukan ukuran droplet dan stabilitas emulsi. Hal ini disebabkan semakin cepat pengadukan menyebabkan tegangan antar muka akan semakin kecil dan semakin banyak partikel yang terpecah sehingga ukuran droplet emulsi akan semakin kecil (Jayanudin, dkk., 2018). Larutan ditambahkan secara tetes-tetes bertujuan agar tidak terjadi solidifikasi antara material penyalut Kitosan-TPP yang membuat droplet membentuk gumpalan besar. Selanjutnya, nanoemulsi dihomogenisasi lebih lanjut dengan ultrasonic selama 10 menit dengan pulser 30 dan power 35 yang bertujuan memecah molekul-molekul yang berukuran besar sehingga dihasilkan nanopartikel dengan ukuran lebih kecil. Homogenisasi dengan ultrasonik didasarkan pada sifat kuvitasi akustik gelombang ultrasonik yang merambat melewati medium cair. Gelombang ultrasonik yang merambat melewati medium akan menghasilkan getaran. Getaran ini akan memberikan pengadukan yang intensif pada proses gelasi ionik (Asfari., 2015).



Gambar 13. Proses pembuatan nanoemulsi dan ilustrasi nanoemulsi CS/TPP

Sumber: Grenha., A., (2012) dan Cho, Y., dkk., (2010)

Sintesis nanoemulsi lengkuas merah dengan metode gelasi ionik didasarkan pada interaksi elektrostatik muatan yang berlawanan antara muatan positif dari gugus amino kitosan dengan muatan negatif dari ion tripolifosfat. Muatan kitosan dan natrium tripolifosfat yang berlawanan menyebabkan pembentukan droplet secara spontan. Penambahan natrium tripolifosfat bertujuan untuk membentuk ikatan silang antara molekul kitosan sehingga dapat digunakan sebagai dinding yang melingkupi dimana obat terperangkap. Menurut Setiawan, dkk., (2015) kitosan yang di *cross-linking* akan membentuk matriks yang bersifat stabil dengan jaringan yang kuat sehingga memiliki kekuatan mekanik yang lebih baik dan menarik kelarutan ke pH yang lebih netral.

5.5 Karakterisasi Nanoemulsi Ekstrak Lengkuas Merah

Ukuran partikel penting dilakukan karakterisasi karena menentukan distribusi distribusi *in vivo*, dan kemampuan *targetting* dalam dari sistem penghantaran obat. Distribusi ukuran partikel akan mempengaruhi penghantaran dan stabilitas nanopartikel (Laili, dkk., 2014). Karakterisasi nanoemulsi dilakukan untuk mengetahui karakteristik nanoemulsi yang dihasilkan berdasarkan ukuran partikel (Z_{Ave}), dan polidispersi indeks (PI). Karakterisasi nanoemulsi dilakukan dengan instrumentasi *Particle Size Analyzer* (PSA) dengan metode *Dynamic Light Scattering* (DLS). Pengukuran PSA didasarkan pada hamburan cahaya laser oleh partikel-partikel dalam sampel karena gerak Brown partikel koloid. Gerak Brown

yang terjadi pada partikel zat cair akan mengalami tumbukan satu sama lain maupun tumbukan dengan dinding ruang (Nuraeni, dkk., 2013).

Tabel 1. Hasil karakterisasi nanoemulsi

Formula	Rasio	Hasil		
		PI	Zave	Pola distribusi ukuran
CS/TPP/Ekstrak	5:1:1	0.488	320.3	Monodispersi
CS/Ekstrak	5:1	0.333	412	Monodispersi

Nilai distribusi ukuran partikel dan indeks polidispersitas digunakan sebagai parameter keseragaman ukuran. Rentang nilai indeks polidispersitas antara 0 sampai 1. Nilai indeks polidispersitas yang mendekati nol menunjukkan distribusi partikel yang homogen. Sedangkan nilai PI yang melebihi 0,5 menunjukkan heterogenitas yang tinggi sehingga, dapat meningkatkan terjadinya aglomerasi karena adanya tumbukan antara partikel.

Hasil pengamatan ukuran partikel dan indeks polidispersitas menunjukkan nanoemulsi yang diperoleh berukuran nanometer (<1000 nm) dan distribusi ukuran yang homogen (<0,5). Nanoemulsi kitosan dengan penambahan NaTPP memiliki ZAve yang lebih rendah yaitu 320,3 nm. Sedangkan nanoemulsi tanpa penambahan NaTPP memiliki ZAve 412. Na-TPP yang ditambahkan dalam proses sintesis menyebabkan pembentukan ikatan silang antara gugus amina kitosan dengan gugus muatan negatif TPP. Ikatan silang yang terbentuk membuat rantai-rantai kitosan semakin rapat dan membentuk nanopartikel yang lebih kecil dibandingkan nanopartikel tanpa pengait silang (Alauhdin, dkk., 2014). Penambahan TPP bertujuan untuk meningkatkan stabilitas dengan menghambat terbentuknya agregat sehingga nanopartikel yang terbentuk memiliki ukuran partikel yang kecil. Semakin kecil ukuran partikel akan memudahkan partikel masuk kedalam sel dan meningkatkan absorpsinya di dalam tubuh (Mannuela., 2016). Berdasarkan penelitian James, S., (2007) dalam Pakki, dkk., (2016) ukuran nanoemulsi kitosan – tripolifosfat yang dihasilkan dengan metode gelasi ionic memiliki ukuran partikel antara 200-500 nm.

Nanoemulsi telah terbentuk dengan ukuran dalam skala nanometer dan distribusi ukuran yang homogen. Berdasarkan parameter ukuran nanoemulsi CS/TPP/Ekstrak memiliki ukuran droplet yang lebih kecil dibandingkan nanoemulsi CS/Ekstrak. Namun, berdasarkan parameter distribusi ukuran nanoemulsi CS/Ekstrak memiliki distribusi ukuran partikel yang lebih baik dari nanoemulsi CS/TPP/Ekstrak.

5.6 Uji Stabilitas Nanoemulsi

Stabilitas merupakan faktor penting untuk dilakukan karakterisasi karena berkaitan dengan kualitas dan khasiat dari suatu produk obat. Uji stabilitas nanoemulsi dilakukan dengan mengamati parameter fisik. Stabilitas nanoemulsi salah satunya dapat dievaluasi berdasarkan ada atau tidaknya endapan. Kecepatan pengendapan dipengaruhi oleh gaya gravitasi dan gerak Brown. Semakin kecil ukuran nanoemulsi maka semakin kecil masa dan gravitasinya. Stabilitas suatu disperse cair juga dipengaruhi oleh gaya tolak menolak antar partikel (Efiana., dkk., 2013). Pengamatan stabilitas fisik yang diamati pada penelitian ini yaitu homogenitas, dan pH. Stabilitas nanoemulsi diamati dalam 2 kondisi suhu yaitu 6 °C dan temperature kamar (27 °C). Pengaruh suhu menyebabkan pemisahan masing-masing fasa nanoemulsi. Suhu yang terlalu tinggi menyebabkan pemecahan ikatan polimer (depolimerisasi) rantai molekul kitosan (Rochima., 2007). Selain itu kelarutan kitosan pada suhu tinggi akan meningkat yang menyebabkan droplet pecah.

Tabel 2. Uji stabilitas nanoemulsi pada suhu ruang

Waktu Pengamatan	Temperatur kamar					
	CS/TPP/Ekstrak			CS/ekstrak		
	Ph	Bau	Keadaan	pH	Bau	Keadaan
Minggu 0	4	Asam	Homogen	4	Asam	Homogen
Minggu 1	4	Asam	Homogen	4	Asam	Homogen
Minggu 2	4	Asam	Homogen	4	Asam	Homogen
Minggu 3	4	Asam	Homogen	4	Asam	Homogen
Minggu 4	4	Asam	Homogen	4	Asam	Homogen

Tabel 3. Uji stabilitas nanoemulsi pada 6 °C

Waktu Pengamatan	6 °C					
	Kitosan/ekstrak/NaTPP			Kitosan/ekstrak		
	Ph	bau	Keadaan	pH	Bau	Keadaan
Minggu 0	4	Asam	Homogen	4	Asam	Homogen
Minggu 1	4	Asam	Homogen	4	Asam	Homogen
Minggu 2	4	Asam	Homogen	4	Asam	Homogen
Minggu 3	4	Asam	Homogen	4	Asam	Homogen
Minggu 4	4	Asam	Homogen	4	Asam	Homogen

Hasil pengamatan terhadap homogenitas nanopartikel pada Tabel 2 dan 3 menunjukkan hasil yang homogen pada kondisi temperature kamar dan 4 °C selama penyimpanan 1-4 minggu, dengan tidak terlihatnya pemisahan antara fasa surfaktan dan ko-surfaktan. Nanoemulsi CS/TPP/Ekstrak dan CS/Ekstrak tidak menunjukkan adanya pemisahan fasa selama 4 minggu penyimpanan. Kedua nanoemulsi memiliki penampilan fisik yang transparan, homogen, dan bau yang tidak mengalami perubahan. Hal ini menunjukkan tidak adanya reaksi kimia yang menyebabkan sistem nanoemulsi menjadi tidak stabil. Adapun untuk penyimpanan pada suhu 6 °C kedua nanoemulsi stabil sampai minggu ke-4.

Hasil pengukuran pH selama penyimpanan sampai minggu ke-4 dalam suhu ruang dan 6 °C tidak mengalami perubahan pH. Dari kedua formula nanoemulsi untuk penyimpanan pada temperature ruang dan 6 °C menunjukkan stabilitas yang baik. Kitosan dalam asam asetat akan terion menjadi gugus $-NH_3^+$, sedangkan dalam aquadest Na-TPP akan terion menjadi ion-ion tripolifosfat. Dengan banyaknya molekul kitosan dan TPP yang terion maka pembentukan *crosslink* akan semakin banyak, yang membuat terbentuknya lapisan pelindung yang kuat untuk melindungi senyawa obat sehingga memiliki stabilitas yang baik (Efiana, dkk., 2013). Stabilitas nanoemulsi akan menurun dalam pH yang rendah, hal ini disebabkan kitosan mudah larut pada pH yang rendah yang menyebabkan pelepasan obat menjadi lebih cepat.

Nanoemulsi CS/TPP/Ekstrak dan CS/Ekstrak memiliki stabilitas fisik berupa homogenitas, bau, dan pH yang baik. Nanoemulsi CS/TPP/Ekstrak dan

CS/Ekstrak memiliki bau asam dan pH yang konstan selama penyimpanan 1-4 minggu. Nanoemulsi CS/TPP/Ekstrak dan CS/Ekstrak memiliki homogenitas yang baik dalam waktu penyimpanan 1-4 minggu dengan tidak menunjukkan perpisahan fasa surfaktan dan ko-surfaktan.

5.7 Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri dilakukan untuk mengetahui pengaruh nanoemulsi ekstrak lengkuas merah sebagai antibakteri *Klebsiella pneumoniae*. Metode uji yang dilakukan pada penelitian ini adalah metode cakram. Metode ini dinilai lebih efisien dalam pengerjaan dan memiliki resiko kegagalan yang lebih kecil dari metode uji yang lain. Kepekaan bakteri *Klebsiella pneumonia* terhadap senyawa uji nanoemulsi ekstrak etanol lengkuas merah dilihat dari ukuran zona bening atau zona hambat yang terbentuk. Parameter uji yang diamati adalah zona bening, yaitu area bening disekeliling *paper disc* sebagai indikasi terhambatnya pertumbuhan mikroorganisme ekskresi zat antimikroba oleh kompetitornya (Ariyani., 2018).

Hal pertama yang dilakukan dalam uji aktivitas antibakteri nanoemulsi ekstrak lengkuas merah terhadap bakteri *Klebsiella pneumonia* yaitu membuat media uji, sterilisasi alat dan bahan. Mulyati., (2009) menjelaskan media uji yang digunakan harus memenuhi syarat yaitu mengandung semua nutrisi yang dibutuhkan oleh mikroba, memiliki pH yang sesuai, tidak mengandung zat penghambat, dan media harus steril. Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Mueller Hinton Agar* (MHA). Dilaporkan oleh Putra., (2015) media MHA direkomendasikan oleh WHO digunakan sebagai media tes antibakteri untuk bakteri aerob dan *fakultative anaerob bacteria* serta untuk makanan dan materi klinis. Selain itu media MHA memberikan hasil yang baik dan reproduksibel, serta memberikan pertumbuhan bakteri patogen yang memuaskan (Putra., 2015). Utomo, dkk., (2018) melaporkan media MHA memiliki pH yang netral yaitu $7,3 \pm 0,2$ pada $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ sehingga meminimalkan pengaruh terhadap bakteri saat dilakukan uji. Menurut Tsuji, dkk., (2013) melaporkan bakteri *Klebsiella pneumonia* dapat tumbuh dengan optimum pada suhu $25 - 41\text{ }^{\circ}\text{C}$ dan pH lingkungan $5,4 - 8,2$.

Sterilisasi dilakukan untuk mematikan semua mikroorganisme atau kontaminan untuk menciptakan suasana aseptis. Sebelum dilakukan sterilisasi alat

dan bahan dilapisi dengan kapas lalu dilapisi kembali dengan koran. Hal ini dilakukan untuk mencegah masuknya atau kontaminasi bakteri pada alat dan bahan yang telah disterilisasi. Sterilisasi dilakukan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 2 jam.

Suspensi bakteri dibuat dengan mengambil 1 ose bakteri uji *Klebsiella pneumoniae* hasil pembiakan media miring, kemudian disuspensikan ke dalam larutan NaCl 0,9%. Selanjutnya suspensi bakteri di homogenkan menggunakan vortex dan disamakan kekeruhannya dengan standar *Mc. Farland* 1×10^8 CFU/mL. Larutan NaCl 0,9% digunakan untuk mengencerkan konsentrasi bakteri. Penyetaraan konsentrasi suspensi bakteri dengan larutan standar *Mc. Farland* yaitu untuk memperkirakan kepadatan sel yang akan digunakan dalam uji (Haris, dkk., 2013). Keuntungan penggunaan standar *Mc. Farland* adalah tidak dibutuhkan waktu inkubasi yang lama untuk memperoleh kepadatan bakteri yang diinginkan. Akan tetapi kekurangan penggunaan standar *Mc. Farland*, yaitu akan terjadi perbedaan pandangan untuk mengamati tingkat kekeruhan dari sel bakteri (Sutton, 2011).

Media uji yang telah memadat ditambahkan suspensi bakteri dengan cara mengoleskan suspensi bakteri menggunakan *cotton swab steril* secara merata pada permukaan media. *Paper disc* direndam dalam larutan uji dan diletakkan diatas media menggunakan pinset steril. Selanjutnya semua cawan petri diinkubasi pada suhu 37 °C dan diamati setelah 24 jam masa inkubasi dimana hal tersebut merupakan waktu dan suhu optimum pertumbuhan bakteri, dengan mengamati diameter hambat yang dihasilkan menggunakan alat *colony counter*. Dalam pengujian digunakan kontrol positif antibiotik eritromisin, ampicillin, dan kontrol negatif digunakan larutan kitosan, larutan pembawa. Kontrol positif digunakan untuk membandingkan zona hambat yang terbentuk, sedangkan kontrol negatif berfungsi untuk mengetahui pengaruh matriks nanoemulsi terhadap bakteri *Klebsiella pneumoniae*.

Tabel 4. Diameter Zona hambat Nanopartikel Chi-TPP-Ekstrak

pengulangan	Diameter Zona Hambat (mm)				
	Chi-TPP-ekstrak	ampicillin (kontrol +)	eritromisin (kontrol +)	kitosan 1% (kontrol -)	penyalut (kontrol -)
1	9.1	10.4	33.8	9.1	9.5
2	9.1	10.9	34.4	9.8	9.3
3	9.1	10.1	25.9	9.1	9.8
Rata-rata	9.1	10.5	31.4	9.3	9.5

Tabel 5. Diameter zona hambat Nanopartikel Chi-Ekstrak

pengulangan	Diameter zona hambat (mm)			
	chitosan-ekstrak	Ampicillin	eritromisin	kitosan
1	9.5	11.4	28.2	10.0
2	9.5	11.4	32.6	9.5
3	9.5	11.6	26.4	9.5
rata -rata	9.5	11.5	29.1	9.7

Berdasarkan Tabel 4 dan 5 diketahui zona hambat nanoemulsi CS/TPP/Ekstrak dan nanoemulsi CS/Ekstrak memiliki zona hambat yang dihasilkan nanoemulsi CS/TPP/Ekstrak dan CS/Ekstrak sebesar 9,1 mm dan 9,5 mm. Respon yang diberikan oleh bakteri *Klebsiella pneumonia* terhadap nanoemulsi CS/TPP/Ekstrak dan nanoemulsi CS/Ekstrak serta antibiotik berbeda. Bakteri *Klebsiella pneumonia* lebih efektif dihambat oleh antibiotik dengan luas zona hambat yang dihasilkan pada ampicillin sebesar 10,5 mm dan eritromisin sebesar 31,4 mm. Zona hambat yang dihasilkan antibiotik ampicillin dan eritromisin lebih besar dibandingkan nanoemulsi CS/TPP/Ekstrak dan CS/Ekstrak. Hal ini berarti kedua antibiotik memiliki spektrum luas dengan kekuatan daya hambat yang tinggi dalam menghambat pertumbuhan bakteri.

Eritromisin memiliki mekanisme penghambatan dengan menghambat sintesis protein melalui pengikatan reversible pada ribosom sub unit 50S dan tempat ikatannya pada 23S rRNA. Menurut Setiabudy (2007) eritromisin akan menghambat translokasi kompleks t-RNA-peptida dari asam amino ke peptida. Akibatnya, rantai polipeptida tidak dapat diperpanjang karena asam amino tidak dapat menerima kompleks tRNA-asam amino yang baru. Sedangkan ampicillin

memiliki mekanisme aksi penghambat sintesis dinding sel bakteri dengan mengikat satu atau lebih ikatan penisilin-protein, sehingga menghambat tahap akhir transpeptidase sintesis peptidoglikan. Akibat penghambatan ini biosintesis dinding sel bakteri terhambat dan sel menjadi lisis (Kurniawati., 2015). Menurut Davis dan Stout., (1971) dalam Fitriah, dkk., (2017) daya hambat dikelompokkan menjadi 4 yaitu sangat kuat bila zona hambat > 20 mm, kuat 10-20 mm, sedang 5-10 mm, dan lemah <5 mm. berdasarkan parameter tersebut, maka daya hambat yang dihasilkan nanoemulsi CS/TPP/Ekstrak dan CS/Ekstrak dikategorikan sedang karena menghasilkan diameter hambat kurang dari 10 mm.

Uji normalitas dilakukan menggunakan uji *Shapiro-wilk* menunjukkan nilai sig >0,05 yang berarti data tidak terdistribusi normal. Data zona hambat nanoemulsi CS/TPP/Ekstrak dan CS/Ekstrak tidak memenuhi syarat untuk dilakukan uji *ANOVA one way* maka dilakukan uji *Kruskal-Wallis*. Uji *Kruskal-Wallis* nanoemulsi CS/TPP/Ekstrak menunjukkan nilai sig (2-tailed) <0,05 yang berarti nanoemulsi CS/TPP/Ekstrak mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Klebsiella pneumonia*. Uji *Kruskal-Wallis* nanoemulsi CS/Ekstrak menunjukkan nilai sig (2-tailed) <0,05 yang berarti CS/Ekstrak mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Klebsiella pneumonia*. Aktivitas antibakteri nanoemulsi CS/TPP/Ekstrak dan CS/Ekstrak disebabkan oleh adanya senyawa metabolit dalam ekstrak lengkuas merah. Mekanisme penghambatan antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri dapat berupa kerusakan dinding sel yang menyebabkan lisis, mengubah permeabilitas membrane, denaturasi protein, dan penghambatan kerja enzim intraseluler (Ariyani, dkk., 2018).

Klebsiella pneumonia merupakan bakteri gram negatif yang memiliki sifat kurang rentan terhadap senyawa antibakteri. Hal ini disebabkan struktur dinding sel bakteri gram negatif lebih kompleks karena tersusun atas lapisan luar berupa lipoprotein, lapisan tengah lipopolisakarida, dan lapisan dalam peptidoglikan. Selain itu faktor yang mempengaruhi nilai kemampuan antibakteri dalam menghambat pertumbuhan *Klebsiella pneumonia* adalah karena konsentrasi senyawa yang jumlah tidak cukup menghasilkan penghambatan. Hal ini disebabkan proses pelarutan ekstrak lengkuas merah sebelum dilakukan pembuatan

nanoemulsi tidak larut sempurna. Menurut Trisia, dkk., (2018) daya hambat bahan antimikroba akan berbanding lurus dengan konsentrasi. Konsentrasi minimum yang dapat digunakan untuk menghambat pertumbuhan bakteri bahan antimikroba perlu dilakukan pengujian untuk mengetahui nilai MBC (*Minimum Bactericidal Concentration*).

Kitosan memiliki sisi aktif pada gugus amina, ketika dilarutkan dalam asam akan bermuatan positif. Muatan positif kitosan akan berinteraksi dengan muatan negatif molekul asam amino penyusun dinding sel bakteri yang menyebabkan kebocoran membran intraseluler. Gugus amina kitosan memiliki pasangan electron bebas yang dapat menarik mineral Ca^{2+} yang terdapat pada dinding sel mikroba dan Mg^{2+} pada ribosom. Hal ini menyebabkan timbulnya kerusakan konstituen intraseluler yang menyebabkan kematian mikroba (Yuliana., 2011).

Penambahan Na-TPP sebagai pengait silang diduga dapat mengstabilkan muatan positif kitosan karena adanya interaksi elektrostatik antara kitosan dan TPP. Selain itu, penambahan TPP menyebabkan nanoemulsi semakin rapat dan memperkuat matriks nanoemulsi. Semakin rapatnya matriks nanoemulsi menyebabkan senyawa metabolit yang terperangkap dalam matriks sulit terlepas kembali (Wahyono., 2010). Ukuran nanoemulsi yang besar menyebabkan nanopartikel banyak diabsorpsi lebih banyak dipermukaan sel bakteri karena tidak mampu menembus dinding sel bakteri. Gaveau, dkk., (2017) melaporkan ketebalan lapisan peptidoglikan bakteri gram negatif antara 2-6 nm dan ukuran porin 2-10 nm. Porin berfungsi sebagai saluran keluar masuknya zat melalui membran luar dinding sel gram negatif (Tsai, dkk., 2011).

Uji aktivitas antibakteri nanoemulsi ekstrak lengkuas merah dengan metode cakram dinilai kurang efektif. Pada metode difusi disk, cakram disk direndam dalam zat uji, kemudian diletakkan diatas media uji, sehingga memungkinkan nanoemulsi masih tertahan pada cakram menyebabkan osmolaritas terjadi tidak menyeluruh. Faktor yang mempengaruhi zona hambat adalah kemampuan difusi bahan antibakteri kedalam media, pH media, dan interaksi dengan mikroba yang di uji (Soleha., 2015).

Nanoemulsi kitosan dalam paru-paru akan terdegradasi melalui reaksi depolimerisasi oleh lisozim pada sel saluran pernapasan bawah. Degradasi kitosan oleh lisozim akan menghasilkan oligosakarida yang tidak beracun, dan lebih lanjut akan membentuk senyawa yang termasuk dalam glikosaminoglikan dan glikoprotein yang dapat dimetabolisme lagi menjadi senyawa yang lebih kecil. Lisozim merupakan enzim protease non spesifik yang terkandung dalam cairan serum manusia (Kasipah dan Wiwin., 2014). Sehingga, perlu dilakukan uji pelarutan dalam asam untuk mengetahui degradasi nanoemulsi. Apabila aktivitas nanoemulsi memiliki aktivitas yang lebih baik, penggunaan nanoemulsi ekstrak lengkuas merah dilakukan secara oral. Hal ini disebabkan lambung memiliki pH berkisar antara 1,5-3,5 (Marieb dan Katja., 2010).

5.8 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia ekstrak lengkuas merah merupakan uji pendahuluan untuk mengetahui golongan-golongan senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak lengkuas merah. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah reaksi pengujian warna dengan pereaksi. Uji kualitatif pada penelitian ini meliputi uji alkaloid, flavonoid, tannin, saponin, steroid, dan fenol. Hasil uji kualitatif ekstrak etanol lengkuas merah dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Hasil uji skrining fitokimia ekstrak lengkuas merah

Golongan senyawa				
Alkaloid	Tannin	Flavonoid	Steroid	Saponin
(+)	(+)	(-)	(+)	(-)
Terbentuk endapan berwarna jingga	Terjadi perubahan warna larutan hijau kehitaman	Tidak terjadi perubahan warna	Terjadi perubahan warna larutan hijau	Tidak terbentuk busa

Keterangan :

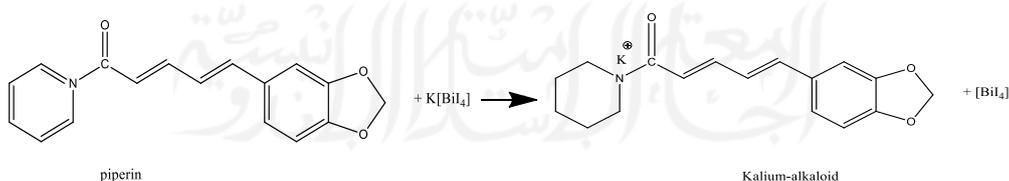
(+) : Mengandung senyawa

(-) : Tidak mengandung senyawa

Hasil uji ekstrak etanol rimpang lengkuas merah mengandung senyawa tannin, alkaloid, dan steroid yang merupakan senyawa antibakteri. Temuan adanya

senyawa metabolit sekunder dalam ekstrak lengkuas merah dilaporkan Subramanian dan Suja., (2011) ekstrak etanol rimpang lengkuas merah mengandung senyawa metabolit sekunder tannin, flavonoid, alkaloid, dan fenol.

Uji kualitatif alkaloid digunakan pereaksi Dragendroff. Pereaksi Dragendroff mengandung bismut nitrat dan kalium iodide dalam larutan asam asetat glasial (kalium tetraiodobismutat(III)). Alkaloid merupakan senyawa bersifat basa penambahan asam klorida 2 N berfungsi untuk meningkatkan kelarutan alkaloid, karena reaksi asam klorida dengan alkaloid akan membentuk garam yang mudah larut dalam air. Selanjutnya, ditambahkan pereaksi Dragendroff dihasilkan endapan berwarna jingga yang menandakan ekstrak etanol lengkuas merah positif mengandung alkaloid. Uji kualitatif alkaloid dengan pereaksi Dragendroff didasarkan pada reaksi pengendapan yang terjadi akibat adanya penggantian ligan. Alkaloid memiliki atom nitrogen dengan pasangan electron bebas yang bersifat sebagai donor electron yang dapat membentuk ikatan kovalen koordinasi dengan ion logam K^+ (Ergina, dkk., 2014). Untoro, dkk., (2016) telah mengisolasi senyawa golongan alkaloid dari rumpang lengkuas merah (*Alpinia purpurata*) diperoleh senyawa piperin. Reaksi yang terjadi pada uji alkaloid piperin dengan pereaksi Dragendroff disajikan pada Gambar 14.

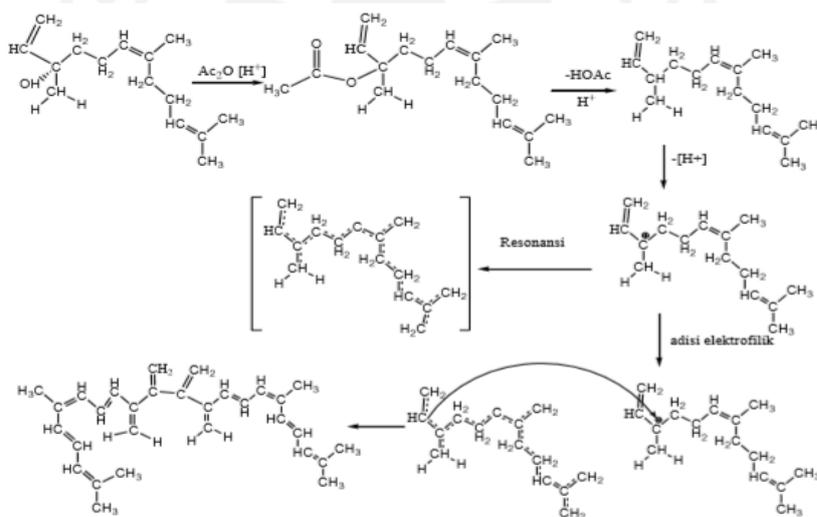


Gambar 14. Reaksi antara alkaloid piperin dengan pereaksi deagenderoff

(Sumber: Untoro, dkk., 2016).

Identifikasi senyawa steroid dilakukan menggunakan pereaksi Libermann-Burchard. Pereaksi Libermann-Burchard terbuat dari asam asetat anhidrida dingin, asam asetat glasial dan asam sulfat. Uji kualitatif steroid dengan pereaksi libermann-Burchard didasarkan pada kemampuan steroid membentuk warna oleh asam sulfat dalam pelarut asam asetat anhidrida. Perubahan warna ini terjadi karena

oksidasi senyawa steroid dengan pembentukan ikatan rangkap terkonjugasi. Prinsip pengujian ini didasarkan pada kondensasi dan pelepasan H₂O. Reaksi yang terjadi diawali dengan asetilasi gugus hidroksil dengan penambahan asam asetat anhidrat. Gugus asetil adalah gugus pergi yang baik, sehingga akan lepas dan membentuk ikatan rangkap. Selanjutnya, terjadi pelepasan gugus hidrogen yang menyebabkan ikatan rangkap berpindah. Senyawa ini akan mengalami resonansi yang bertindak sebagai elektrofil atau karbokation. Serangan elektrofil menyebabkan adisi elektrofil yang diikuti dengan pelepasan hidrogen. Pelepasan gugus hidrogen dan elektronnya menyebabkan perpanjangan konjugasi (Siadi., 2012). Penelitian yang telah dilakukan oleh Laksono, dkk., (2014) senyawa terpenoid yang ada dalam ekstrak rimpang lengkuas merah adalah senyawa 3,7,11-trimetil-1,6,10-dodekatrien-3-ol atau nerolidol. Reaksi yang terjadi dalam uji disajikan pada Gambar 15.

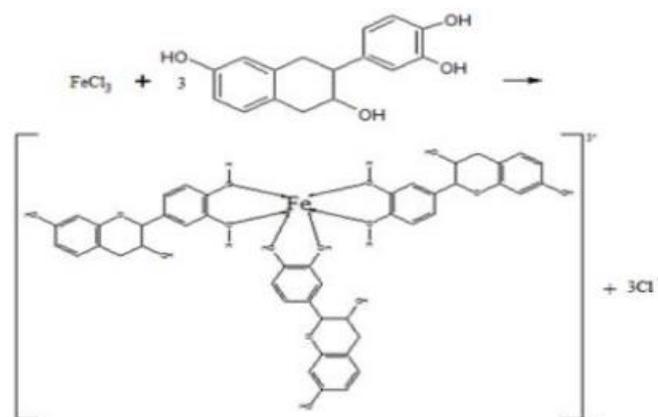


Gambar 15. Reaksi senyawa nerolidol (3,7,11-trimetil-1,6,10-dodekatrien-3-ol) dengan pereaksi Libermann-Buchard

(Sumber: Laksono., 2004)

Identifikasi senyawa tannin dilakukan dengan penambahan FeCl₃ 1%. Uji tannin dengan pengambahan FeCl₃ didasarkan pada pembentukan kompleks berwarna hijau kehitaman antar senyawa tannin dengan ion logam Fe³⁺. Uji kualitatif dengan penambahan FeCl₃ untuk menentukan adanya gugus fenol dalam

ekstrak. Pembentukan senyawa kompleks antara tannin dengan FeCl_3 karena atom O dalam senyawa tannin memiliki pasangan electron bebas yang berperan sebagai donor electron akan membentuk ikatan koordinasi dengan Fe^{3+} sebagai akseptor electron. Reaksi ion Fe^{3+} dapat mengikat 3 ligan tannin, sehingga terdapat enam pasang electron bebas yang dikoordinasikan ke atom pusat (Ergina, dkk., 2014). Reaksi yang terjadi antara tannin dengan FeCl_3 disajikan dalam Gambar 16.



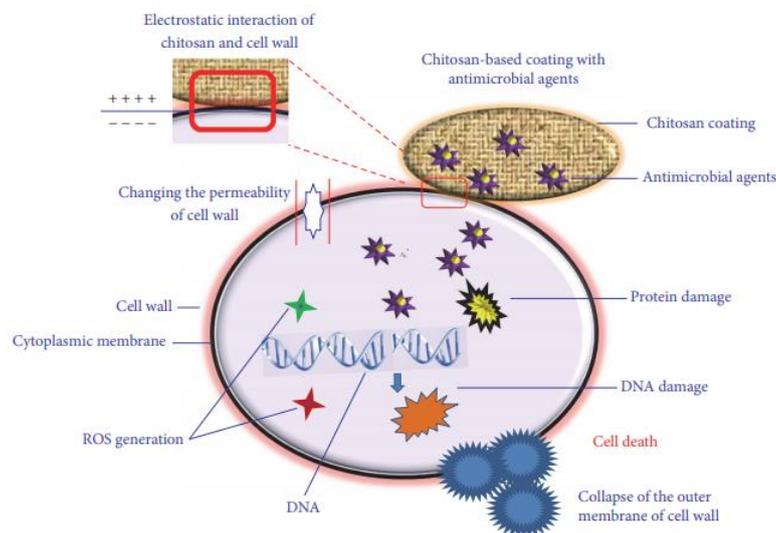
Gambar 16. Reaksi antara tannin dengan FeCl_3
(Sumber: Sulasmi, dkk., 2019)

5.8.1 Mekanisme antibakteri

Kitosan memiliki sifat mukoadesif dan polimer dengan sifat ini memiliki kemampuan untuk meningkatkan distribusi dan penetrasi obat. Muatan kationik pada kitosan memberikan sifat mukoadhesif yang memungkinkan untuk menempel pada mukosa sel epitel paru-paru. Sifat mukoadhesif kitosan dapat mempercepat transport obat menuju alveolus. Nanoemulsi kitosan akan terdegradasi melalui depolimerisasi oleh lisozim pada sel saluran pernapasan bawah (Adianto, dkk., 2019).

Mekanisme aktivitas kitosan sebagai material pembawa terjadi karena adanya interaksi antara muatan positif dari gugus amina ($-\text{NH}_3$) dari kitosan dengan muatan negatif gugus karboksilat ($-\text{COO}-$) pada permukaan membrane sel bakteri. Interaksi ini akan membentuk ikatan elektrostatis yang menyebabkan melemahnya dan gangguan pada membrane sel bakteri. Hal ini akan menyebabkan senyawa aktif

mudah masuk dan berinteraksi dengan komponen dalam penyusun sel bakteri (Xing, dkk., 2016).



Gambar 17. Interaksi kitosan sebagai material pembawa senyawa antibakteri.

(Sumber: Xing, dkk., 2016)

Hasil skrining fitokimia ekstrak etanol 96% rimpang lengkuas merah menunjukkan adanya kandungan alkaloid, terpenoid, dan tannin yang memiliki potensi sebagai senyawa antibakteri. Alkaloid memberikan aksi antibakteri dengan memanfaatkan keaktifan gugus basanya. Mekanisme antibakteri alkaloid didasarkan pada interaksi atom nitrogen pada alkaloid dengan asam amino penyusun dinding sel bakteri. Peptidoglikan merupakan komponen penyusun dinding sel bakteri sehingga adanya interaksi dengan alkaloid menyebabkan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel (Maulid., 2016).

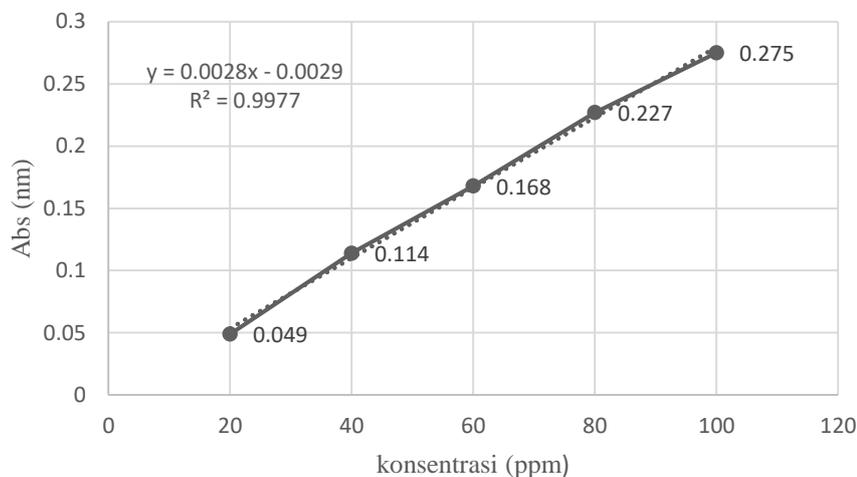
Tannin dalam ekstrak etanol lengkuas merah memiliki aktivitas antibakteri yang berhubungan dengan kemampuannya menonaktifkan adhesi bakteri, mengganggu transport protein sel. Tannin juga dapat mengkhelat ion ion bivalen pada membrane sel. Terlepasnya kation kation dari membran terluar bakteri akan memudahkan senyawa antibakteri masuk kedalam sel. Membrane bakteri mengandung lapisan lipopolisakarida yang terikat oleh kation divalent Ca^{2+} dan Mg^{2+} . Ikatan hidrogen yang terbentuk antara gugus OH dengan fosfolipid

membrane sel menyebabkan perubahan permeabilitas pada komponen asam lemak dan fosfolipid. Kondisi ini menimbulkan permeabilitas membrane terganggu yang menyebabkan terbebasnya sitoplasma bakteri (Dewi, dkk., 2013).

Steroid dalam ekstrak etanol lengkuas merah memiliki aktivitas antibakteri dengan menghambat pertumbuhan bakteri *Klebsiella pneumonia* berhubungan membrane lipid dan sensitivitas komponen steroid yang menyebabkan kebocoran pada liposom bakteri. Steroid dapat berinteraksi dengan membrane fosfolipid sel yang bersifat permeable terhadap senyawa-senyawa lipofilik yang menyebabkan integritas membrane mengalami penurunan. Morfologi membrane sel yang berubah menyebabkan sel rapuh dan lisis (Sapara, dkk., 2016).

5.9 Uji Kuantitatif Kadar Tannin

Uji kadar tannin dilakukan menggunakan spektrofotometer Uv-Vis pada panjang gelombang 700 nm. Pengukuran tannin total dengan spektrofotometer Uv-Vis dilakukan dengan mereaksikan asam tanat dengan reagen pembentuk warna yaitu natrium karbonat dan folin denis. Pembentukan warna tannin dengan reagen didasarkan pada reaksi reduksi dan oksidasi, dimana tannin bertindak sebagai reduktor dan folin bertindak sebagai oksidator. Tannin teroksidasi akan merubah fosmolibdat dalam reagen folin denis menjadi warna biru yang dapat menyerap cahaya pada daerah visible (Andriyani, dkk., 2010). Penambahan Na_2CO_3 berfungsi memberikan suasana basa sehingga reaksi reduksi folin denis oleh gugus hidroksi dari tannin dalam sampel membentuk kompleks molybdenum-tungsten yang berwarna biru. Asam tanat digunakan sebagai standar tannin, dimana asam tanat merupakan golongan tannin sehingga dapat digunakan sebagai pembanding dalam pengukuran tannin total. Larutan standar tannin dibuat untuk mengetahui hubungan konsentrasi dengan serapan. Dari larutan standar asam tanat 100 ppm dibuat seri larutan dengan konsentrasi 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, dan 80 ppm.



Gambar 18. Kurva standar asam tanat

Gambar 18 menunjukkan absorbansi pada setiap larutan standar asam tanat yang selanjutnya digunakan sebagai kurva standar. Hasil pengukuran larutan standar asam tanat menunjukkan semakin besar konsentrasi maka semakin besar absorbansi yang diperoleh. Hal ini sesuai dengan hukum Lambert-Beer, dimana perubahan konsentrasi pada sampel akan mengubah absorbansi dengan suatu faktor yang konstan (Sayuthi dan Puji., 2017). Kurva baku adalah kurva yang diperoleh dengan memplotkan nilai absorbansi dengan konsentrasi larutan standar. Berdasarkan pengukuran tersebut didapatkan persamaan linear $y = 0.0028x - 0.0029$ dengan nilai koefisien korelasi (R^2) adalah 0.9977. Berdasarkan nilai koefisien korelasinya maka kurva tersebut berlaku hukum Lambert-Beer sehingga dapat digunakan sebagai penentuan kadar tannin dalam sampel ekstrak etanol lengkuas merah yang belum diketahui konsentrasinya.

Tabel 7. Hasil uji kadar tannin

Ulangan	Konsentrasi Tannin (ppm)		
	Absorbansi	Kadar Tannin	Rerata
1	0.074	27.4643	
2	0.087	32.1071	29.7262
3	0.080	29.6071	

Tabel 7 menunjukkan hasil pengukuran kadar tannin total dari sampel lengkuas merah (*Alpinia purpurata* K), diperoleh rata-rata kadar tannin sebesar 29.7262 ppm. Penetapan kadar tannin total ekstrak lengkuas merah didasarkan pada pembentukan senyawa kompleks berwarna biru kehijauan yang diukur pada daerah visible. Tannin merupakan senyawa yang cenderung polar sehingga ekstraksi dengan etanol dapat mengekstrak senyawa tannin secara optimal (Septiana dan Ari., 2012).

Hubungan antara aktivitas antibakteri nanoemulsi ekstrak etanol lengkuas merah dengan kandungan tannin ada pada jumlah gugus hidroksilnya dan berkaitan dengan toksisitasnya terhadap mikroorganisme. Banyaknya gugus hidroksil (OH) pada senyawa tannin maka penghambatan mikroorganisme akan semakin kuat. Mekanisme penghambatan oleh senyawa tannin berkaitan dengan target penyerangan senyawa tannin terhadap peptidoglikan yang merupakan penyusun dinding sel bakteri. Tannin akan mengganggu sintesis peptidoglikan yang menyebabkan pembentukan dinding sel menjadi tidak sempurna dan mengakibatkan inaktivasi sel bakteri pada sel inang (Fitriah, dkk., 2017). Dinding sel yang tidak sempurna menyebabkan pemblokiran aliran nutrient pada bakteri yang menyebabkan kematian sel. Mekanisme ini dinilai lebih baik karena menyebabkan kematian sel semakin cepat (Damayanti, dkk., 2016).

BAB IV

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat diambil kesimpulan:

1. Hasil maserasi menunjukkan adanya pengaruh nyata variasi waktu dan volume pelarut terhadap hasil rendemen ($P < 0,05$) dengan hasil optimum pada waktu maserasi 30 jam dengan rendemen 3,707% dan volume 600 mL dengan rendemen 3,205%.
2. Nanoemulsi ekstrak lengkuas merah berhasil disintesis menggunakan metode gelasi ionik, dengan rasio 5:1:1 antara kitosan 0,1 %, Na-TPP 0,1%, ekstrak 12,5%, dan rasio 5:1 antara kitosan 0,1% dan ekstrak 12,5%.
3. Karakterisasi menggunakan instrumen *Particle Size Analyzer* (PSA) menunjukkan nanoemulsi CS/TPP/Ekstrak memiliki ukuran 320,3 nm dengan PI 0,488 dan nanoemulsi CS/Ekstrak memiliki ukuran 412 nm dengan PI 0,333.
4. Nanoemulsi CS/TPP/Ekstrak dan CS/Ekstrak memiliki stabilitas yang baik, homogen pada pH 4.
5. Nanoemulsi ekstrak lengkuas merah memiliki aktivitas antibakteri *Klebsiella pneumoniae* dengan penghambatan sedang.
6. Skrining fitokimia menunjukkan senyawa metabolit sekunder dalam rimpang lengkuas merah yaitu alkaloid, tannin, dan steroid.
7. Uji kadar tannin dilakukan menggunakan spektrofotometer Uv-Vis dengan kadar tannin sebesar 29,7262 ppm.

6.2 Saran

Disarankan kepada peneliti selanjutnya untuk mendeteksi jenis senyawa yang ada dalam rimpang lengkuas merah, optimasi konsentrasi minimum ekstrak lengkuas merah yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri, pemilihan pelarut pembuatan nanoemulsi yang aman dalam uji antibakteri. Uji stabilitas fisik lebih lanjut menggunakan PSA. Sehingga, diketahui senyawa, konsentrasi rimpang lengkuas merah yang berperan sebagai antibakteri, dan pelarut yang aman dalam

pembuatan nanoemulsi serta uji antibakteri. uji aktivitas antibakteri nanoemulsi ekstrak lengkuas merah dilakukan selama 3 hari sehingga diketahui zona hambat yang dihasilkan setiap penambahan hari. Stabilitas ukuran nanoemulsi selama penyimpanan. Selain itu perlu dilakukan uji pelarutan nanoemulsi kitosan menggunakan asam untuk mengetahui degradasi nanoemulsi



DAFTAR PUSTAKA

- Abubakar, P.M.S., Fatimawali., dan Paulina, V.Y.Y., 2019, Uji Daya Hambat Ekstrak Lengkuas Merah (*Alpinia purpurata (Vieill.) K.Schum*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Klebsiella pneumonia* Isolat Sputum Pada Penderita Pneumonia Resisten Antibiotik Seftriakson, *FHARMACON Jurnal Ilmiah Farmasi*, **8**, 1, 11-21.
- Abdassah, M., 2017, Nanoemulsi Dengan Gelasi Ionik, *Farmaka*, **15**, 1, 45-52.
- Adianto, C., Arief, A.N., dan Gergorius, G.M., 2019, Review Potensi Trogan-Spray: Nano Spray Ekstrak Akar Widuri Sebagai *Phytomedicine* Terapi Asma, *J. Ilmiah Penalaran dan Penelitian Mahasiswa*, **3**, 1, 1-23.
- Afifah, A., Tunggul, A.P., dan I Dewa, S.A.P.P., 2017, Resistensi *Klebsiella sp.* Terhadap Meropenem di RSUD PROF. DR.MARGONO SOEKARJO PURWOKERTO, *Scripta Biological*, **4**, 2, 135-137.
- Agustina, D., Diana, C.M., Hanifa, R.A.S., Dion, K., 2019, uji sensitivitas antibiotik terhadap *Staphylococcus aureus* yang dideteksi dalam sputum pasien dengan pneumonia yang dirawat di rumah sakit, *J. of agromedicine and medical sciences*, **5**, 1, 20-24.
- Akiyama, H., K., Fujili., O. Yamasaki., T. Oono., dan K. Iwatsuki, 2001, Antibacterial Action of Several Tannin Against *Staphylococcus aureus*, *J. of Antimicrobial Chemotheraphy*, **48**, 487-491.
- Alauhdin, M., dan N. Widiarti., 2014, Sintesis dan Modifikasi Lapis Tipis Kitosan-Tripolifosfat, *J. MIPA*, **37**, 1, 46-52.
- Alta, U., Galih, P., dan Linda, Y.S., 2019, Formulasi Bedak Tabur dari Ekstrak Lengkuas Merah (*Alpinia purpurata* K.Schum), *J. 'Aisyiyah Medika*, **4**, 3, 312-326.
- Andriyani, D., Pri, I.U., dan Binar, A.D., 2010, Penetapan Kadar Tannin Daun Rambutan (*Nephelium lappaceum.L*) Secara Spektrofotometer Ultraviolet Visibel, *PHARMACY*, **7**, 2, 1-11.
- Amalia, A., Irma, S., dan Risa, N., 2017, Aktibitas Antibakteri Ekstrak Etil Asetat Daun Sembung (*Blumea balsamifera (L.) DC.*) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA), *Prosiding Seminar Nasional Biotik*, ISBN 978-602-60401-3-8, 387-391.
- Amalia, A., Enceng, S., dan Nurul, M., 2019, Rendemen dan Karakteristik Fisik Ekstrak Oleoresin Daun Sirih Hijau (*Peper battle L.*) Dengan Pelarut Heksan, *J. POLBAN*, **10**, 1, 273-278.

- Apondi, O.E., Oduor, O.C., Gye, B.K., dan Kipkoech, M.K., 2016, High Prevalence of Multi-drug Resistant *Klebsiella pneumoniae* in Tertiary Hospital in Western Kenya, *African journal of Infectious Diseases*, **10**, 89-95.
- Ariyani, H., Muhammad, N., Hamidah., dan Mita, K., 2018, Uji Eektivitas Antibakteri Ekstrak Kulit Limau Kuit (*Cytrus hystrix* DC) Terhadap Beberapa Bakteri, *J. UMBJM*, **2**, 1, 136-141.
- Arman, M., Agus, P., dan Sihana., 2014, Desain Sistem Instrumentasi Proses Destilasi Fraksinasi Batch Berbasis Kendali Suhu, *ASEAN Journal of Sistem Engineering*, **2**, 2, 71-79.
- Astriyani, F., 2011, Preparasi Kitosan-TRIPOLIFOSFAT Sebagai Eksipien Dalam Sediaan Tblet Enterik, *Skripsi*, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia, Depok.
- Asafari, S., 2015, Preparasi dan Karakterisasi Nanopartikel Zink Pektinat Mengandung Diltiazem Hidroklorida Dengan Metode Gelasi Ionik, *Skripsi*, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, UIN Syarif Hidayatullah, Jakarta.
- Baharutan, K., Fatimawali., dan Adeanne, W., 2015, Uji kepekaan bakteri yang diisolasi darisubtum pasien penderita bronkitis kronik yang menjalaninrawat jalan di RSUP Prof D.R R. D. Kanou Manado terhadap antibiotik ampicillin, eritromisin, dan ciprofloxacin, *J. Ilmiah Farmasi PHARMACON*, **4**, 4, 139-146.
- Cavalieri, S.J., I.D. Rankin., R.J. Harbeck., R.S. Sautter., Y.S. McCarter., S.E. Sharp., J.H. Ortez., dan C.A. Spiegel., 2005, *Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing*. American Society for Microbiology, USA.
- Chamidah, A., Chistina, N.W., dan Nahda, N.F., 2019, Pemanfaatan Kitosan Larut Air sebagai *Hand Sanitizer* Antiseptik, *J. Perikanan Universitas Gadjah Mada*, **21**, 1, 9-16.
- Damanik, D. D. P., Nurhayati, S., Rosdanelli, H., 2014, Ekstraksi Katekin Dari Daun Gambir (*Uncaria gambir roxb*) Dengan Metode Maserasi, *J. Teknik Kimia*, **3**, 2, 10-14.
- Damayanti, W., Emma, R., dan Zahidah, H., 2016, Aplikasi Kitosan Sebagai Antibakteri Pada Filet Patin Selama Penyimpanan Suhu Rendah, *JPHPI*, **19**, 3, 321-328.
- Dewangga, V.S., Muhammad, T.Q., 2019, Potensi Antibakteri Ekstrak Etanol Herba Meniran Hijau (*Phyllanthus niruri* Linn.) dalam Menghambat Pertumbuhan *Staphylococcus aureus*, *J. Kesehatan Kusuma Husada*, **10**, 2, 114-150.

- Dewi, E., Khairil., dan Mudatsir., 2013, Analisa Potensi Antibakteri The Rosela Terhadap Paparan *Enteropathogenic Escherchia coli* (EPEC) pada Mencit (*Mus musculus*), *J. Kedokteran Syah Kuala*, **13**, 2, 77-85.
- Doorduijn, D.J., S. Suzan., H.MR., Willem, V.S., dan Bart, W.B., 2016, Complement resistance mechanism of *Klebsiella pneumoniae*, *J. Immunobiology*, **221**, 10, 1102-1109.
- Dwicahyani, T., Sumardianto., dan Laras, R., 2018, Uji Bioaktivitas Ekstrak Teripang Keling *Holothuria atra* Sebagai Antibakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*, *J. Peng. Dan Biotek. Hasil Pi*, **7**, 1, 15-24.
- Efiana, N.A., Akhmad, K.N., dan Ronny, M., 2013, Formulasi Nanoemulsi Losartan Dengan Pembawa Kitosan, *J. Ilmu Kefarmasian Indonesia*, **11**, 1, 7-12.
- Elfidasari, D., Nita, N., Anita, M., Aishah, F., dan Siti, F.C., 2013, Deteksi bakteri *Klebsiella pneumonia* pada beberapa jenis rokok konsumsi masyarakat, *J. Al-Azhar Indonesia Seri Sains dan Teknologi*, **2**, 1, 41-47.
- Ergina., Siti, N., dan Indarini, D.P., 2014, Uji Kualitatif Senyawa Metabolit Sekunder Pada Daun Palado (*Agave angustifolia*) Yang Diekstraksi Dengan Pelarut Air dan Etanol, *J. Akad. Kim*, **3**, 3, 136-172.
- Fachriyah, E., Dewi, K., dan Pratama, J. W., 2018, *Improvement of Bioactivity with Nanoparticle Fabrication: Cytotoxic Test of Ethanol, N-Hexane, and Ethyl Acetate extract from Red Galangal Rhizome (Alpinia purpurata (vieill.) K. Schum) in Bulk and Nanoparticle Size Using BSLT Method*, *J. Kimia Sains dan Aplikasi*, **21**, 1, 39-43.
- Faruq, A.A., 2018, Formulasi dan Karakterisasi Fisetin Nanokristal Dengan Metode Bottom Up (Presipitasi), Skripsi, Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi.
- Fitriah., Mappiratu., dan Prismawiryanti., 2017, Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Tanaman Johar (*Cassia siamea Lamk*) dari Beberapa Tingkat Kepolaran Pelarut, *KOVALEN*, **3**, 3, 242-251.
- Geveau, A., Clemence, C., Christian, R., Patrice, B., Etienne, D., dan Chistian, C., 2017, Bacteria transfer by deformation through microfiltration membran, *J. of Membran Science*, **523**, 446-455.
- Ghazlina, W.P.E., 2019, Pola Resistensi Cephalosporin Generasi III Dan Morofenem pada Bakteri *Klebsiella pneumoniae* di Laboratorium Kesehatan Daerah Lampung Tahun 2017, Skripsi, Fakultas Kedokteran, Universitas Lampung, Lampung.
- Grenha, A., 2012, *Chitosan nanoparticles: a survey of preparation methods*, *J. of Drug Targeting*, **20**, 4, 291-300.

- Harjanti., R.S., 2014, Kitosan Dari Limbah Udang sebagai Bahan Pengawet Ayam Goreng, *J. Rekayasa Proses*, **8**, 1, 12-19.
- Haris, A., Arniati dan Werorilangi, S., 2013, Uji Antibakteri Patogen Ekstrak Sponge Menggunakan Metode High Troughout Screening (HTS) dengan Indikator MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5diphenyltetrazolium bromide), *Laporan Penelitian*, Universitas Hasanudin, Makassar.
- Haryati, S.D., Sri, D., dan Wildiani, W., 2017, Perbandingan Efek Ekstrak Buah Alpukat (*Persea Americana Mill*) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* Dengan Metode Disk dan Sumuran, *Prosoding Seminar Nasional Publikasi Hasil-Hasil Penelitian dan Pengabdian Masyarakat*, 348-352.
- Husniati., dan Eva, O., 2014, Sintesis Nano Partikel Kitosan dan Pengaruhnya Terhadap Inhibisi Bakteri Pembusuk Jus Nenas, *J. Dinamika Penelitian Industri*, **25**, 2, 89-95.
- Hutauruk, C.J., dan Anggraeni, J.W., 2016, Potensi Nanopartikel Sebagai Pengobatan Tuberkulosis Paru, *MAJORITY*, **5**, 5, 113-118.
- Jayanudin., Ayu, Z.L., dan Feni, N., 2014, Pengaruh Suhu dan Rasio Pelarut Ekstraksi Terhadap Rendemen dan Viskositas Natrium Alginat dari Rumput Laut Coklat (*Sargasum sp*), *J. Integrasi Proses*, **5**, 1, 51-55.
- Kailaku, S.I., Ira, M., dan Andi, N.M., 2014, Formulation of Nanoencapsulated Catechin With Chitosan As Encapsulation Material, *Procedia Chemistry*, **9**, 235-241.
- Kandou, L.A., Fatimawali., dan Widdhi, B., 2016, Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Rimpang Lengkuas Merah (*Alpinia purpurata* (Vieill) K. Schum) terhadap Bakteri *Klebsiella pneumoniae* Isolat Sputum Penderita Bronkitis Secara In Vivo, *J. Ilmiah Farmasi FARMACON*, **5**, 3, 131-137.
- Kasipah, C., dan Wiwin, W., 2014, Pelapisan Kitosan Pada Kain Katun dengan Cara Perendaman dan Elektrosinning, *Arena Tekstil*, **29**, 2, 99-106.
- Kencana, A.I., 2009, Perlakuan sonikasi terhadap kitosan: viskositas dan bobt molekul kitosan, *Skripsi*, Fkultas Mtematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Khasanah, R.N., Ika, P., Titik, N., dan Nunung, y., 2019, Prevalensi Multidrug-Resistan Klebsiella pneumonia dan Evaluasi Kesesuaian Antibiotik Empiris Berdasarkan Nilai Prediksi Farmakokinetik Terhadap Outcome Klinis di RSUP Dr. Soeradji Tirtinegoro Klaten, *Majalah Farmaseutik*, **16**, 1, 27-33.
- Khumairoh, I. S., 2018, Uji Aktivitas Antifingi Lengkuas Merah (*Alpinia purpurata*), Kunyit (*Curcuma longa*), dan Jahe (*Zingiber officinale*) terhadap

Candida albicans, Skripsi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Sunan Ampel, Surabaya.

- Koirewoa, Y. A., Fatimawali, F., dan Weny, W., 2012, Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid Dalam Daun Beluntas (*Pluceha indica L.*), Skripsi, FMIPA UNSURAT, Manado.
- Kurniawati, E., 2015, Daya Antibakteri Ekstrak Etanol Tunas Bambu Apus Terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* Secara In Vitro, *J. Wiyata*, **2**, 2, 193-199.
- Kurniasih, M., dan Dwi, K., 2009, Aktivitas Antibakteri Kitosan Terhadap Bakteri *S. aureus*, *Molekul*, **4**, 1, 1-5.
- Kusriani, R.H., dan Shofia, A., 2015, Skrining Fitokimia dan Penetapan Kadar Senyawa Fenolik Total Ekstrak Rimpang Lengkuas Merah dan Rimpang Lengkuas Putih (*Alpinia galangal L*), *Prosiding Seminar Nasional Penelitian dan PKM Kesehatan*, **1**, 1, 295-302.
- Laksono, F.B., Enny, F., dan Dewi, K., 2014, Isolasi dan Uji Antibakteri Senyawa Terpenoid Ekstrak Rimpang Lengkuas Merah (*Alpinia purpurata*), *J. Kimia Sains dan Aplikasi*, **17**, 2, 37-42.
- Laili, H.N., Lina, W., dan Lusua, O.R.K.S., 2014, Preparasi dan Karakterisasi Nanopartikel Kitosan-Naringenin dengan Variasi Rasio Massa Kitosan-Natrium Tripoliposfat, *J. Pustaka Kesehatan*, **2**, 2, 308-313.
- Lubis, V.a., Yusticia, K., dan Elizabeth, B., 2016, Identifikasi Bakteri Saluran Pernapasan Bawah Non Tuberkulosis (Non TB) dan Pola Resistensinya Pada Penderita Diabetes Melitus di RSUP M. Djamil, *J. Kesehatan Andalas*, **5**, 3, 692- 696.
- Luliana, S., Nera, U.P., dan Kris, N.M., 2016, Pengaruh Cara Pengeringan Simplisia Daun Senggani (*Melastoma malabathricum L.*) Terhadap Aktivitas Antioksidan Menggunakan Metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), *Pharm Sci Res*, **3**, 3, 120-129.
- Lusiani, R. M., 2018, Perbandingan Eektivitas Antibakteri Ekstrak Rimpang Lengkuas Putih (*Alpinia galangal W.*) dan Rimpang Lengkuas Merah (*Alpinia purpurata K.Schum*) Terhadap Bakteri *Escherichia coli*, Skripsi, Program Studi Farmasi, STIK SITI KHADIJAH, Palembang.
- Mannuela, N., 2016, Preparasi dan Evaluasi Nanopartikel Azitromisin-Kitosan dan Uji Aktivitas Antibakteri Terhadap Bakteri *Propionibacterium acnes*, Skripsi, Fakultas Kedokteran, Universitas Tanjungpura, Pontianak.
- Mardiyanto., Herlina., Najma, A.F., dan Yutry, R., 2019, Formulasi dan Evaluasi Sediaan Submikro Partikel Gelasi Ionik Pembawa Ekstrak Daun *Pluceha*

indica Sebagai Antibakteri Pada Kulit Tikus Putih Jantan Galur Wistart, *J. Sains Farmasi dan Klinis*, **6**, 2, 171-179.

- Mardliyati, E., Sjaikhurrizal, E.M., dan Damai, R.S., 2012, Sintesis Nanoemulsi Kitosan-Tripoly Phosphate Dengan Metode Gelasi Ionik: Pengaruh Konsentrasi Dan Rasio Volume Terhadap Karakteristik Partikel, *Prosiding Pertemuan Ilmiah Ilmu Pengetahuan dan Teknologi Bahan 2012*, ISSN 1411-2213, 90-93.
- Marieb, E.N., dan Katja, H., 2010, *Human anatomy and psikology*, San Fransisco: Benjamin Cummings, ISBN 0-8053-9591-1.
- Martien, R., Adhyatmika., Iramie, D.K.I., Verda, F., dan Dian, P.S., 2012, Perkembangan Teknologi Nanopartikel Sebagai Sistem Penghantaran Obat, *Majalah Farmaseutik*, **8**, 1, 133-144.
- Maulid, R.R., 2016, Eektivitas Antibakteri Ekstrak Daun Patikan Kebo (*Euphorbia hirta*) terhadap Bakteri *Escherchia coli* dan *Staphylococcus aureus* dengan Pelarut Yang Berbeda Secara Invitro, *Skripsi*, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri MaulanaMalik Ibtahim, Malang.
- Markham, K.R., 1988, *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*, ITB, Bandung
- Maulianawati, D., dan Awaludin., 2018, Uji Toksisitas dan Analisis Kandungan Fitokimia Ekstrak Metanoldan Kloroform Daun Uban (*Nephrolepis bisserata*), *J. Harpodon Borneo*, **11**, 2, 68-74.
- Mohanraj, V.J., dan Chen, Y., 2006, Nanoparticles: A Review, *Tropical journal of pharmaceutical Research*, **5**, 1, 561-573.
- Mukhriani., 2014, Ekstraksi, Pemisahan Senyawa, dan Identifikasi Senyawa Aktif, *J. Kesehatan*, **7**, 2, 361-367.
- Mulyati, E. S., 2009, Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etil Asetat Daun Ceremai (*Phyllanthus acidus* (L.) Skeels) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dan Bioautografinya, *Skripsi*, Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta, Surakarta.
- Muchtar, H., Ida, T.A., dan Gustri, Y., 2015, Pengaruh kecepatan pengadukan dan kehalusan gambir serta variasi komposisi terhadap beberapa sifat fisika dalam pembuatan tinta cetak, *J. Litbang Industri*, **5**, 2, 131-139
- Ngajow, M., Jemmy, A., dan Vanda, S.K., 2013, Pengaruh Antibakteri Ekstrak Kulit Batang Matoa (*Pometia pinnata*) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* Secara In Vitro, *J. MIPA UNSRAT ONLINE*, **2**, 2, 128-132.

- Ningrum, R., Elly, P., Sukarsono., 2016, Identifikasi senyawa alkaloid dari batang karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa*) sebagai bahan ajar biologi untuk sma kelas x, *J. Pendidikan Biologi Indonesia*, **2**, 3, 231-236.
- Nuraeni, W., Isti, D., Eva, M.W., dan Maulana, E.S., 2013, Verifikasi Kinerja Alat *Particle Size Analyzer* (PSA) HORIBA LB-550 untuk Penentuan Distribusi Ukuran Nanopartikel, *Prosiding Seminar Nasional dan Teknologi Nuklir*, Bandung.
- Nirwana, A.P., dan Indah, T.S., 2017, Potensi Antibakteri Ekstrak Etanol dan Etil Asetat Daun Benalu *Dendrophloe pentandra* terhadap *Klebsiella pneumonia* Penghasil ESBL, *BIOMEDIKA*, **10**, 1, 36-41.
- Nuralifah., Fery, I.A., Parawansah., dan Aulif, P., 2018, Uji Aktivitas Antibakteri Sediaan Krim Anti Jerawat Ekstrak Etanol Terpurifikasi Daun Sirih (*Piper betle L*) dengan Basis *Vanishing Cream* Terhadap *Propionibacterium acne*, *J. Farmasi, Sains, dan Kesehatan*, **4**, 2, 30-35.
- Nuria, M.C., A. Faizatun., dan Sumantri., 2009, Uji Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Jarak Pagar (*Jatropha cuircas L*) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, dan *Salmonella typhi* ATCC 1408, *Jurnal Ilmu – ilmu Pertanian*, **5**, 26 – 37
- Pakki, E., Sumarheni., Aisyah F., Ismail., dan Syarfina. S., 2016, Formulasi Nanoemulsi Ekstrak Bawang Dayak (*Eleutherine Americana (Aubl) Merr*) dengan Variasi Konsentrasi Kitosan-Tripolifosfat (TPP), *J. Trop Pharm Chem*, **3**, 4, 251-263.
- Porawati, H., dan Ari, K., 2019, Rancang Bangun Alat Penyuling Minyak Atsiri Tumbuhan Nilam Metode Distilasi Air dan Uap, *J. Inovator*, **2**, 1, 20-23.
- Pratiwi, R.H., 2017, Mekanisme Pertahanan Bakteri Patogen Terhadap Antibiotik, *J. Pro-Life*, **4**, 3, 418-429.
- Puasa, N. S., Fatimawali., Weny, I. W., 2019, Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Rimpang Lengkuas Merah (*Alpinia purpurata* K.Schum) terhadap Bakteri *Klebsiella pneumonia* Isolat Urin Pada Penderita Infeksi Saluran Kemih, *J. PHARMACON*, **8**, 4, 982-989.
- Pujiani, T. R., dan Arum, S., 2017, Hubungan Penggunaan APD Masker, Kebiasaan, dan Volume Kertas Bekas dengan ISPA, *Unnes J. of Public Health*, **6**, 3, 185-188.
- Puspita, M.D., 2010, Identifikasi Kandungan Tannin dalam Ekstrak Etanolik Daun Jati Belanda (*Guazuma ulmifolia L*) dari Kebun Tanaman Obat Universitas Sanata Dharma dengan Metode KLT-*DENSITOMETRI*, Skripsi, Fakultas Farmasi, Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta.

- Putra, I. M. A. S., 2015, Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annonae muricata L.*) Dengan Metode Difusi Agar Cakram Terhadap *Escherichia coli*, *Medicamento*, **1**, 1, 15-19.
- Putri, A.I., Agus, S., dan I Nyoman, C., 2018, Karakterisasi Nanoemulsi Kitosan Ekstrak Daun Ubijalar (*Ipomea batatas L*) Menggunakan Metode Gelasi Ionik, *ALOTROP J. Pendidikan dan Ilmu Kimia*, **2**, 2, 203-207.
- Qolbi, N., dan Ratna, Y., 2018, Skrining aktivitas antibakteri ekstrak etanol 70% sepuluh daun tanaman terhadap klebsiella pneumonia, *J. Farmasi Indonesia*, **15**, 1, 8-18.
- Rahmat, S., 2017, Pengaruh Pemberian Ekstrak Lengkuas Merah (*Alpinia purpurata K.Schum*) Terhadap Waktu Kematian Caplak Secara In Vitro, *Skripsi*, Universitas Hasanuddin, Makasar.
- Rahmadhaniyah, N., 2018, Uji Aktivitas n-heksan Rimpang Lengkuas Merah (*Alpinia purpurata K.Schum*) terhadap Bakteri *Streptococcus mutans* Penyebab Karies Gigi, *Skripsi*, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri Alauddin Makassar, Makasar.
- Rawat, M., Deependra, S., S. Saraf., dan Swarnlata, S., 2006, Nanocarriers: Promising Vehicle for Bioactive Drugs, *Biol Pharm Bull*, **29**, 9, 1790-1798.
- Redha, A., 2010, Flavonoid: Struktur Antioksidatif dan Perannya Dalam Sistem Biologis, *J. Berlian*, **9**, 2, 196-202
- Retnaningsih, A., Annisa, P., dan Intan, M., 2019, Intermediate Test of Ethanol Extract Of Pepaya Seeds on *Escherichia coli* and *Sigella dysentriae* Bacteria With The Well Difusion Method, *J. Analis Farmasi*, **4**, 2, 122-129.
- Rialita, T., Winiati, P.R., Lilis, N., dan Budi, N., 2015, Aktivitas Antimikroba Minyak Esensial Jahe Merah (*Zingiber officinale var Rubrum*) dan Lengkuas Merah (*Alpinia purpurata K.Schum*) terhadap Bakteri Patogen dan Perusak Pangan, *AGRITECH*, **35**, 1, 43-52.
- Rinawati, N.D., 2011, Daya Antibakteri Tumbuhan Majapahit (*Crescentia cujete L.*) Terhadap Bakteri *Vibrio alginolyticus*, *Skripsi*, Fakultas Matematika Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh November, Surabaya.
- Rini, D., Sri, N., Enade, P.I., dan Marchaban., 2016, Metode Pemanasan dan Sonikasi Menghasilkan Nanoliposom dari Fosfolipid Lesitin Kedelai (*Soy lecithin*), *J. Farmasi dan Komunitas*, **13**, 1.
- Rochima, E., 2007, Karakterisasi Kitin dan Kitosan Asal Limbah Rajungan Cirebon Jawa Barat, *Buletin Teknologi Hasil Pertanian*, **10**, 1, 9-22.

- Rohmatillah, L. L., 2015, Pembuatan dan Karakterisasi Mikropartikel Kitosan-Tripolifosfat yang Mengandung Diltiazem Hidroklorida Untuk Penghantar Obat Melalui Paru-PARU, *Skripsi*, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, UIN Syarif Hidayatullah, Jakarta.
- Sabathani, A., Simon, B. W., dan Sudarminto, S. Y., 2018, Optimasi Waktu Ekstraksi dan Rasio Bahan Per Pelarut Ekstrak Daun Pepaya Untuk Uji Aktivitas Antibakteri, *J. Teknologi Pertanian*, **19**, 3, 193-206.
- Sagita, E., Elffionora, A., dan Silvia, S., 2010, Pembuatan Matriks dari Kompleks Polielektrolit Kitosan Pektin Untuk sediaan Tablet Mengapung, *J. Majalah Ilmu Kefarmasian*, **7**, 3, 71-83.
- Sari, A.I., dan Yedi, H., 2018, Review: Formulasi Nanoemulsi Terhadap Peningkatan Kualitas Obat, *Farmaka*, **16**, 1, 247-254.
- Sari, B.L., Harry, N., dan Nur, A.K., 2017, Optimasi Waktu Maserasi Parasetamol Dalam Jamu Pegal Linu Yang Beredar Di Bogor Barat, *Pharmamedica Journal*, **2**, 1, 17-29.
- Sari, M.P., dan Widya, H.C., 2019, Tren Pneumonia Balita di Kota Semarang Tahun 2012-2018, *HIGELA*, **3**, 3, 407-4016.
- Sari, T.M., Dira, S., 2017, Analisis Formalin Pada Ikan Asin Kembung di Beberapa Pasar Di Kota Padang Dengan Metoda Spektrofotometer Uv-Vis, *UNES Journal of Scientech Research*, **2**, 2, 159-166.
- Sapara, T.U., Olivia, W., dan Juliatri., 2016, Efektivitas Antibakteri Ekstrak Daun Pacar Air (*Impatiens balsamina L.*) Terhadap Pertumbuhan *Porphyromonas gingivalis*, *J. Ilmiah Farmasi FARMACON*, **5**, 4, 10-17.
- Sayuthi, M.I., dan Puji, K., 2017, Validasi Metode Analisis dan Penetapan Kadar Parasetamol Dalam Sediaan Tablet Secara Spektrofotometer UV-VIS, *Prosiding Seminar Nasional Kimia FMIPA UNESA*, 190-201.
- Siadi, K., 2012, Ekstrak Bungkil Biji Jarak Pagar (*Jatropha curcas*) Sebagai Biopestisida Yang Efektif Dengan Penambahan Larutan NaCl, *J. MIPA*, **35**, 1, 78-83.
- Septiana, A.T., dan Ari, A., 2012., Kajian Sifat Fisikokimia Ekstrak Rumput Laut Coklat *Sargasum duplicatum* menggunakan Berbagai Pelarut dan Metode Ekstraksi, *AGROINTEK*, **6**, 1, 22-28.
- Setiawan, A., Dika, R. W., dan Priyambodo, N. A. N., 2015, Sintesis dan Karakterisasi Kitosan Mikropartikel Dengan Modifikasi Gelasi Ionik, *J. Perikanan*, **17**, 2, 90-95.
- Shah, B. R., Yan L., Weiping J., W., Yaping A., Lei H., Zhenshun L., Wei X., dan Bin L. 2016. Preparation and optimization of pickering emulsion stabilized

- by chitosantripolyphosphate nanoparticles for curcumin encapsulation. *Food Hydrocolloids*, **52**: 369–377.
- Silfia, S., F. Failisnur., dan S. Sofyan., 2018, Analisis gugus fungsi, distribusi, dan ukuran partikel tinta stempel dari ekstrak gambir (*Uncaria gambir Roxb*) dengan senyawa pengomplek NaOH dan Al₂(SO₄)₃, *J. Litbang Industri*, **8**, 1, 31-38.
- Simanjuntak, E.M., Nursia, B.B., dan Sindy, P., 2018, Perbandingan Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Lengkuas Merah (*Alpinia purpurata K. vaSchum*) dan Daun Kunyit (*Curcuma domestika val*) terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*, *J. Penelitian Farmasi Herbal*, **1**, 1, 6-10.
- Soleha, T.U., 2015, Uji Kepekaan Terhadap Antibiotik, *Juke Unila*, **5**, 9, 119-123.
- Siregar, A. F., Agus, S., dan Delianis, P., 2012, Potensi Antibakteri Ekstrak Rumput Laut Terhadap Bakteri Penyakit Kulit *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, dan *Micrococcus luteus*, *J. Of Marine Research*, **1**, 2, 152-160.
- Subramanian, V., dan Suja, S., 2011, Phytochemical Screening of *Alpinia purpurata* (Vieill), *Research Journal of Pharmaceutical, Biological, and Chemical Science*, **2**, 3, 866-871.
- Sulasmi, E. S., Murni, S., Kuni, M., dan Firda, A. Z., 2019, Tannin Identification of 4 Species Pterydophyta from Baluran National Park, *J. of Physics: Conf. Series* **1241** 012002, doi:10.1088/1742-6596/1241/1/012002.
- Sutton, S., 2011, Determination of Inoculum for Microbiological Testing, *Summer*, **15**, 3.
- Tambun, R., Harry, P. L., Christika, P., dan Ester, M., 2016, Pengaruh Ukuran Partikel, Waktu, dan Suhu Pada Ekstraksi Fenol dari Lengkuas Merah, *J. Teknik Kimia*, **5**, 4, 53-56.
- Tarina, N.T.I., dan Sri, A.F.K., 2017, Deteksi Bakteri *Klebsiella pneumonia*, *Farmaka*, **15**, 2, 119-126.
- Taurine, W., Ronny, M., dan Hilda, I., 2013, Preparasi Nanoemulsi Gamavuton-O Menggunakan Kitosan Rantai Pendek dan Tripolifosfat Sebagai *Cross Linker*, *J. Ilmiah Farmasi*, **10**, 2, 60-68.
- Trisia, A., Regina, P., dan Angeline, N.T., 2018, Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Kalanduyung (*Guazuma ulmifolia Lam.*) Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus Aureus* Dengan Metode Difusi Cakram (Kirby-Bauer), *Anterior Jurnal*, **17**, 2, 136-143.

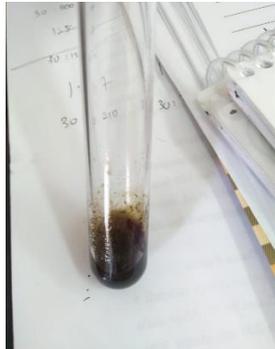
- Tsai, Y.K., Chang-phone, F., Jung-chung, L., Jiun-han. C., Feng-yee, C., Te-li, C., dan Kristopher, S., 2011, *Klebsiella pneumoniae* Outer Membran Porins OmpK35 and OmpK36 Play Roles in Both Antimicrobial Resistance and Virulence, *Antimicrobial Agents And Chemotheraphy*, **55**, 4, 1485-1493.
- Tsuji, A., Takahashi, K., Kaneko, Y., Goto, S., dan Ogawa, M., 2013, The effects of temperature and ph on the growth og eight enteric and nine glucose non-fermenting species of gram-negative rods, *Microbiology and Immunology*, **26**, 1, 15-24.
- Untoro, M., Enny, F., dan Dewi, K., 2016, Isolasi dan Identifikasi Senyawa Golongan Alkaloid dari Rimpang Lengkuas Merah (*Alpinia purpurata*), *J. Kimia Sains dan Aplikasi*, **19**, 2, 58-62.
- Utomo, S. B., Mita, F., Warih, P. L., dan Sri, M., 2018, Antibacterial activity test of the C-4-methoxyphenylcalix[4]resorcinarene compound modified by Hexadecyltrimethylammonium-Bromide against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* Bacteria, *Jurnal Kimia dan Pendidikan Kimia*, **3**, 3, 201-209.
- Vishwakarma, A., P. Sriram., S.P. Preetha., K.G. Tirumurugaan., K. Nagarajan., dan K. Pandian., 2019, Synthesis and Characterization of Chitosan/TPP Encapsulated Curcumin Nanoparticles and Its Antibacterial Efficacy Against Colon Bacteria, *International Journal of Chemical Studies*, **7**, 3, 602-606.
- Verdiana, M., I Wayan, R.W., dan I Dewa, G.M.P., 2018, Pengaruh Jenis Pelarut Pada Ekstraksi Menggunakan Gelombang Ultrasonik Terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kulit Buah Lemon (*Citrus limon* (Linn.)Burm F.), *J. Ilmu dan Teknologi Pangan*, **7**, 4, 213-222.
- Winari, L., 2011, Review Artikel: Penggunaan Formulasi Nanopartikel Kitosan Sebagai Sistem Penghantaran Gen Non Viral Untuk Terapi Gen, *Stomatognatic*, **8**, 3, 142-150.
- Wahyono, D., 2010, Ciri Nanoemulsi Kitosan dan Pengaruhnya Pada Ukuran Partikel dan Evisiensi Penyalutan Ketoprofen, *Tesis*, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Warno, D., Syamsudin., 2013, Unjuk Kerja Spektrofotometer Untuk Analisa Zat Aktif Ketoprofen, *Konversi*, **2**, 2, 57-65.
- Xing, Y., Qinglian, X., Xingchen, L., Cunkun, C., Li, M., Shaohua, L., Zhenming, C., dan Hongbin, L., 2016, Chitosan-Based Coating with Antimicrobial Agents: Preparation, Property, Mechanism, and Application Effectinness on Fruits and Vegetables, *International Journal of Polymer Science*, **2016**, 1-24.
- Yanuartono., H. Purnamaningsih., A. Nururrozi., S. Indarjulianto., 2017, Saponin: Dampak terhadap Ternak (Ulasan), *J. Peternakan Sriwijaya*, **6**, 2, 79-90.
- Yuliana, I.K., 2011, Aktivitas Antibakteri Kitosan Berdasarkan Perbedaan Derajat Deasetilasi dan Bobot Molekul, *Tesis*, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor.

Yulianingtyas, A., dan Bambang, K., 2016, Optimasi Volume Pelarut dan Waktu Maserasi Pengambilan Flavonoid Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.), *J.Teknik Kimia*, **10**, 2, 58-64.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Dokumentasi penelitian



Positif steroid



Positif alkaloid



Negatif Flavonoid



Positif tannin



Ekstrak kasar lengkuas



Negatif saponin



Media uji antibakteri



Suspensi bakteri



Standar Mc. Farland



Standar asam tanat



Maserat lengkuas merah



Simplisia



Proses evaporasi



proses sterilisasi media



proses uji antibakteri



Laminar air flow



Autoklaf



Pengadukan rotary shaker



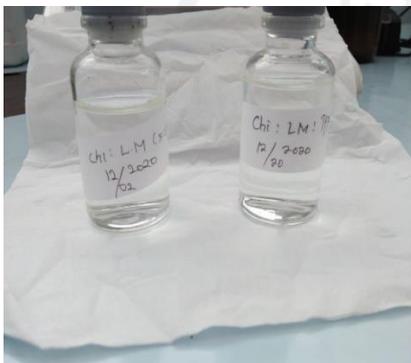
Antibiotik ampicillin



Paper disk



Kapas oles



Nanoemulsi



Ultrasonik



pembuatan nanoemulsi

UNIVERSITAS
ESIA
الجامعة الإسلامية
الاندونيسية

Lampiran 2. Hasil determinasi tanaman



UNIVERSITAS GADJAH MADA
FAKULTAS FARMASI
 Sekip Utara, Yogyakarta 55281 Telp./Fax. +62 274 543120
 http://farmasi.ugm.ac.id, E-mail: farmasi@ugm.ac.id

SURAT KETERANGAN

No.: 12.8.11/UN1/FFA/BF/PT/2019

Yth. Sdri. Nurul Ningtyas Indriani
 NIM. 16612030
 Fakultas MIPA UII
 Yogyakarta

8 November 2019

Bersama ini kami sampaikan hasil identifikasi sampel yang Saudara kirimkan ke Departemen Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi UGM, adalah :

No.Pendaftaran	Jenis	Suku
143	<i>Alpinia purpurata</i> (Vieill) K. Schum.	Zingiberaceae

Demikian, semoga dapat digunakan sebagaimana mestinya.

Mengetahui,
 Dekan

Prof. Dr. Agung Endro Nugroho, M.Si., Apt

Ketua Departemen Biologi Farmasi

Dr. Indah Purwantini, M.Si., Apt

LAMPIRAN 3. Perhitungan % rendemen maserasi variasi waktu

a. 3 jam

Pengulangan 1

$$R = \frac{\text{berat ekstrak kental}}{\text{berat sampel}} \times 100\%$$

$$= \frac{2,254 \text{ g}}{100 \text{ g}} \times 100\%$$

$$= 2,254 \%$$

Pengulangan 2

$$R = \frac{2,244 \text{ g}}{100 \text{ g}} \times 100\%$$

$$= 2,244\%$$

Pengulangan 3

$$R = \frac{2,218 \text{ g}}{100 \text{ g}} \times 100\%$$

$$= 2,218\%$$

b. 6 jam

Pengulangan 1

$$R = \frac{\text{berat ekstrak kental}}{\text{berat sampel}} \times 100\%$$

$$= \frac{2,438 \text{ g}}{100 \text{ g}} \times 100\%$$

$$= 2,438 \%$$

Pengulangan 2

$$R = \frac{2,420 \text{ g}}{100 \text{ g}} \times 100\%$$

$$= 2,420\%$$

Pengulangan 3

$$R = \frac{2,400 \text{ g}}{100 \text{ g}} \times 100\%$$

$$= 2,400\%$$

c. 12 jam

Pengulangan 1

$$R = \frac{\text{berat ekstrak kental}}{\text{berat sampel}} \times 100\%$$

$$= \frac{3,030 \text{ g}}{100 \text{ g}} \times 100\%$$

$$= 3,030 \%$$

Pengulangan 2

$$R = \frac{3,021 \text{ g}}{100 \text{ g}} \times 100\%$$

$$= 3,021\%$$

Pengulangan 3

$$R = \frac{2,990 \text{ g}}{100 \text{ g}} \times 100\%$$

$$= 2,990\%$$

d. 18 jam

Pengulangan 1

$$R = \frac{\text{berat ekstrak kental}}{\text{berat sampel}} \times 100\%$$

$$= \frac{2,659 \text{ g}}{100 \text{ g}} \times 100\%$$

$$= 2,659 \%$$

Pengulangan 2

$$R = \frac{2,613 \text{ g}}{100 \text{ g}} \times 100\%$$

$$= 2,613\%$$

Pengulangan 3

$$R = \frac{2,594 \text{ g}}{100 \text{ g}} \times 100\%$$

$$= 2,594\%$$

e. 24 jam

Pengulangan 1

$$\begin{aligned} R &= \frac{\text{berat ekstrak kental}}{\text{berat sampel}} \times 100\% \\ &= \frac{3,211 \text{ g}}{100 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 3,211 \% \end{aligned}$$

Pengulangan 2

$$\begin{aligned} R &= \frac{3,160 \text{ g}}{100 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 3,160\% \end{aligned}$$

Pengulangan 3

$$\begin{aligned} R &= \frac{3,146 \text{ g}}{100 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 3,146\% \end{aligned}$$

f. 30 jam

Pengulangan 1

$$\begin{aligned} R &= \frac{\text{berat ekstrak kental}}{\text{berat sampel}} \times 100\% \\ &= \frac{3,715 \text{ g}}{100 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 3,715 \% \end{aligned}$$

Pengulangan 2

$$\begin{aligned} R &= \frac{3,710 \text{ g}}{100 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 3,710\% \end{aligned}$$

Pengulangan 3

$$\begin{aligned} R &= \frac{3,695 \text{ g}}{100 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 3,695\% \end{aligned}$$

Lampiran 4. Perhitungan % rendemen variasi volume pelarut

a. 400 ml

Pengulangan 1

$$\begin{aligned} R &= \frac{\text{berat ekstrak kental}}{\text{berat sampel}} \times 100\% \\ &= \frac{1,526 \text{ g}}{100 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 1,526 \% \end{aligned}$$

Pengulangan 2

$$\begin{aligned} R &= \frac{1,484 \text{ g}}{100 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 1,484\% \end{aligned}$$

Pengulangan 3

$$\begin{aligned} R &= \frac{1,408 \text{ g}}{100 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 1,408\% \end{aligned}$$

b. 500 ml

Pengulangan 1

$$\begin{aligned} R &= \frac{\text{berat ekstrak kental}}{\text{berat sampel}} \times 100\% \\ &= \frac{2,132 \text{ g}}{100 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 2,132 \% \end{aligned}$$

Pengulangan 2

$$\begin{aligned} R &= \frac{2,107 \text{ g}}{100 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 2,107 \% \end{aligned}$$

Pengulangan 3

$$\begin{aligned} R &= \frac{2,077 \text{ g}}{100 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 2,077\% \end{aligned}$$

c. 600 ml

Pengulangan 1

$$\begin{aligned} R &= \frac{\text{berat ekstrak kental}}{\text{berat sampel}} \times 100\% \\ &= \frac{3,230 \text{ g}}{100 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 3,205\% \end{aligned}$$

Pengulangan 2

$$\begin{aligned} R &= \frac{3,198 \text{ g}}{100 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 3,198\% \end{aligned}$$

Pengulangan 3

$$\begin{aligned} R &= \frac{3,189 \text{ g}}{100 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 3,189\% \end{aligned}$$

d. 700 ml

Pengulangan 1

$$\begin{aligned} R &= \frac{\text{berat ekstrak kental}}{\text{berat sampel}} \times 100\% \\ &= \frac{2,340 \text{ g}}{100 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 2,340\% \end{aligned}$$

Pengulangan 2

$$\begin{aligned} R &= \frac{2,263 \text{ g}}{100 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 2,263\% \end{aligned}$$

Pengulangan 3

$$\begin{aligned} R &= \frac{2,255 \text{ g}}{100 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 2,255\% \end{aligned}$$

e. 800 ml

Pengulangan 1

$$\begin{aligned} R &= \frac{\text{berat ekstrak kental}}{\text{berat sampel}} \times 100\% \\ &= \frac{2,340 \text{ g}}{100 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 2,340\% \end{aligned}$$

Pengulangan 2

$$\begin{aligned} R &= \frac{2,308 \text{ g}}{100 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 2,308\% \end{aligned}$$

Pengulangan 3

$$\begin{aligned} R &= \frac{2,277 \text{ g}}{100 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 2,277\% \end{aligned}$$

f. 900 ml

Pengulangan 1

$$\begin{aligned} R &= \frac{\text{berat ekstrak kental}}{\text{berat sampel}} \times 100\% \\ &= \frac{1,577 \text{ g}}{100 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 1,577\% \end{aligned}$$

Pengulangan 2

$$\begin{aligned} R &= \frac{1,536 \text{ g}}{100 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 1,536\% \end{aligned}$$

Pengulangan 3

$$\begin{aligned} R &= \frac{1,508 \text{ g}}{100 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 1,508\% \end{aligned}$$

Lampiran 5. Analisis statistika normalitas, homogenitas dan ANOVA maserasi variasi waktu

Tests of Normality							
Waktu		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
rendemen	3 jam	.280	3	.	.938	3	.520
	6 jam	.181	3	.	.999	3	.942
	12 jam	.303	3	.	.908	3	.413
	18 jam	.273	3	.	.946	3	.550
	24 jam	.307	3	.	.903	3	.394
	30 jam	.292	3	.	.923	3	.463

a. Lilliefors Significance Correction

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
3 jam	3	2.23867	.018583	.010729	2.19250	2.28483	2.218	2.254
6 jam	3	2.41933	.019009	.010975	2.37211	2.46655	2.400	2.438
12 jam	3	3.01367	.020984	.012115	2.96154	3.06579	2.990	3.030
18 jam	3	2.62200	.033422	.019296	2.53898	2.70502	2.594	2.659
24 jam	3	3.17233	.034210	.019751	3.08735	3.25732	3.146	3.211
30 jam	3	3.70667	.010408	.006009	3.68081	3.73252	3.695	3.715
Total	18	2.86211	.510576	.120344	2.60821	3.11601	2.218	3.715

Test of Homogeneity of Variances

Rendemen

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.413	5	12	.288

ANOVA

Rendemen					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4.425	5	.885	1.499E3	.000
Within Groups	.007	12	.001		
Total	4.432	17			



Lampiran 6. Analisis statistika bormalitas, homogenitas dan ANOVA maserasi variasi volume pelarut

Tests of Normality

volume pelarut	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
rendemen 400 ml	.242	3	.	.973	3	.685
500 ml	.191	3	.	.997	3	.900
600 ml	.290	3	.	.926	3	.475
700 ml	.355	3	.	.820	3	.163
800 ml	.176	3	.	1.000	3	.982
900 ml	.216	3	.	.988	3	.793

a. Lilliefors Significance Correction

Descriptives

rendemen

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
400 ml	3	1.47267	.059811	.034532	1.32409	1.62124	1.408	1.526
500 ml	3	2.10533	.027538	.015899	2.03693	2.17374	2.077	2.132
600 ml	3	3.20500	.022338	.012897	3.14951	3.26049	3.187	3.230
700 ml	3	2.28600	.046936	.027099	2.16940	2.40260	2.255	2.340
800 ml	3	2.30833	.031501	.018187	2.23008	2.38659	2.277	2.340
900 ml	3	1.54033	.034704	.020036	1.45413	1.62654	1.508	1.577
Total	18	2.15294	.593370	.139859	1.85787	2.44802	1.408	3.230

Test of Homogeneity of Variances

rendemen

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.004	5	12	.456

ANOVA

rendemen					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5.967	5	1.193	775.414	.000
Within Groups	.018	12	.002		
Total	5.985	17			



Lampiran 7. Hasil Karakterisasi PSA


LABORATORIUM PENGUJIAN OBAT, MAKANAN DAN KOSMETIK
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
 Jl. Kaliurang KM. 14,5 Sleman Yogyakarta - Telp. (0274) 899444 ext. 3037 - Fax. (0274) 896439

SERTIFIKAT PENGUJIAN Nomor: 035/LPOMKI/2020
TEST CERTIFIED Halaman: 2 dari 2
HASIL PENGUJIAN Page
TEST RESULT

No	Nama Sampel	Kode	Label	Parameter	Satuan	Hasil Uji*	Metode Uji
1	Chi : TPP : LM	009/C/PSA/I/20	L1R1	Nano Partikel	nm	320,3	Dynamic light scattering menggunakan alat PSA
2	Chi : TPP : LM	010/C/PSA/I/20	L1R1			412,0	

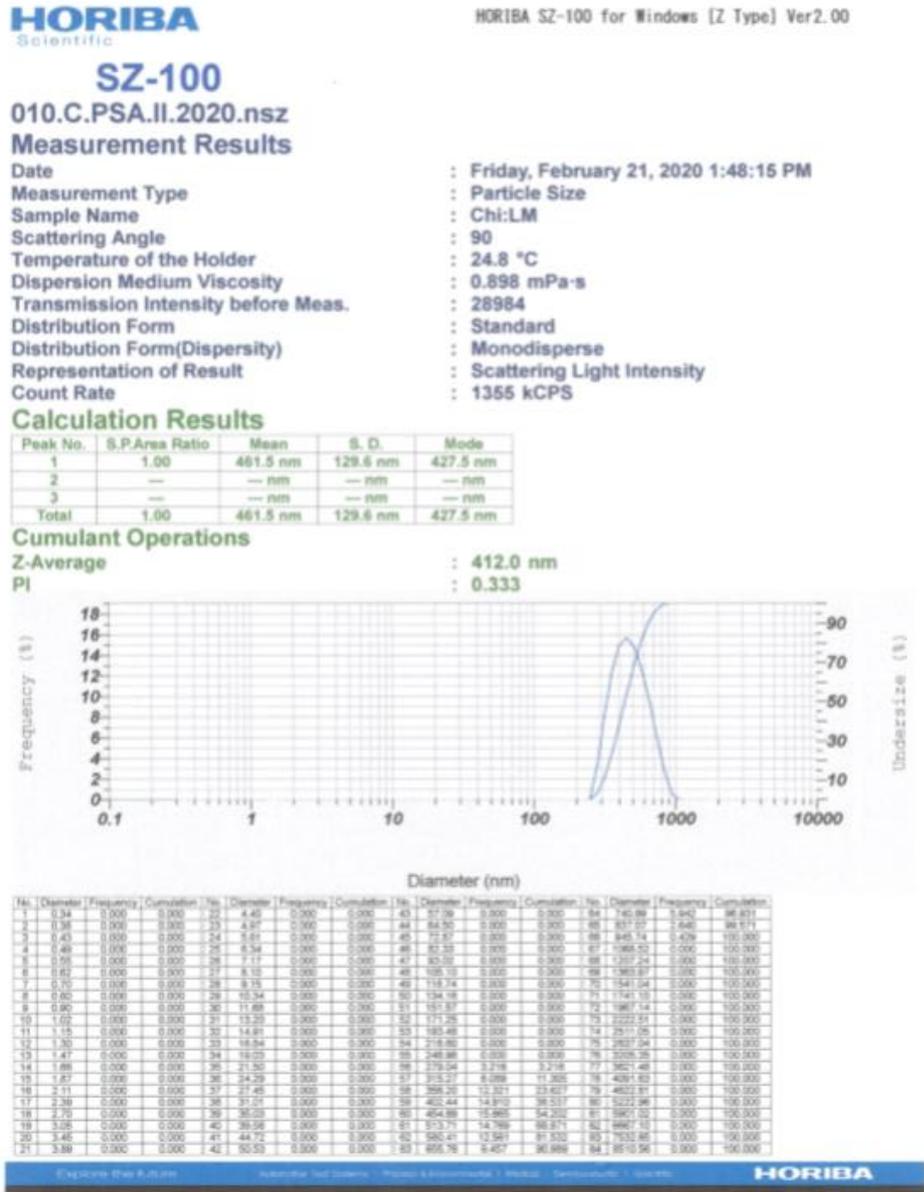
Keterangan *

Yogyakarta, Februari 2020
 Manajer Teknis

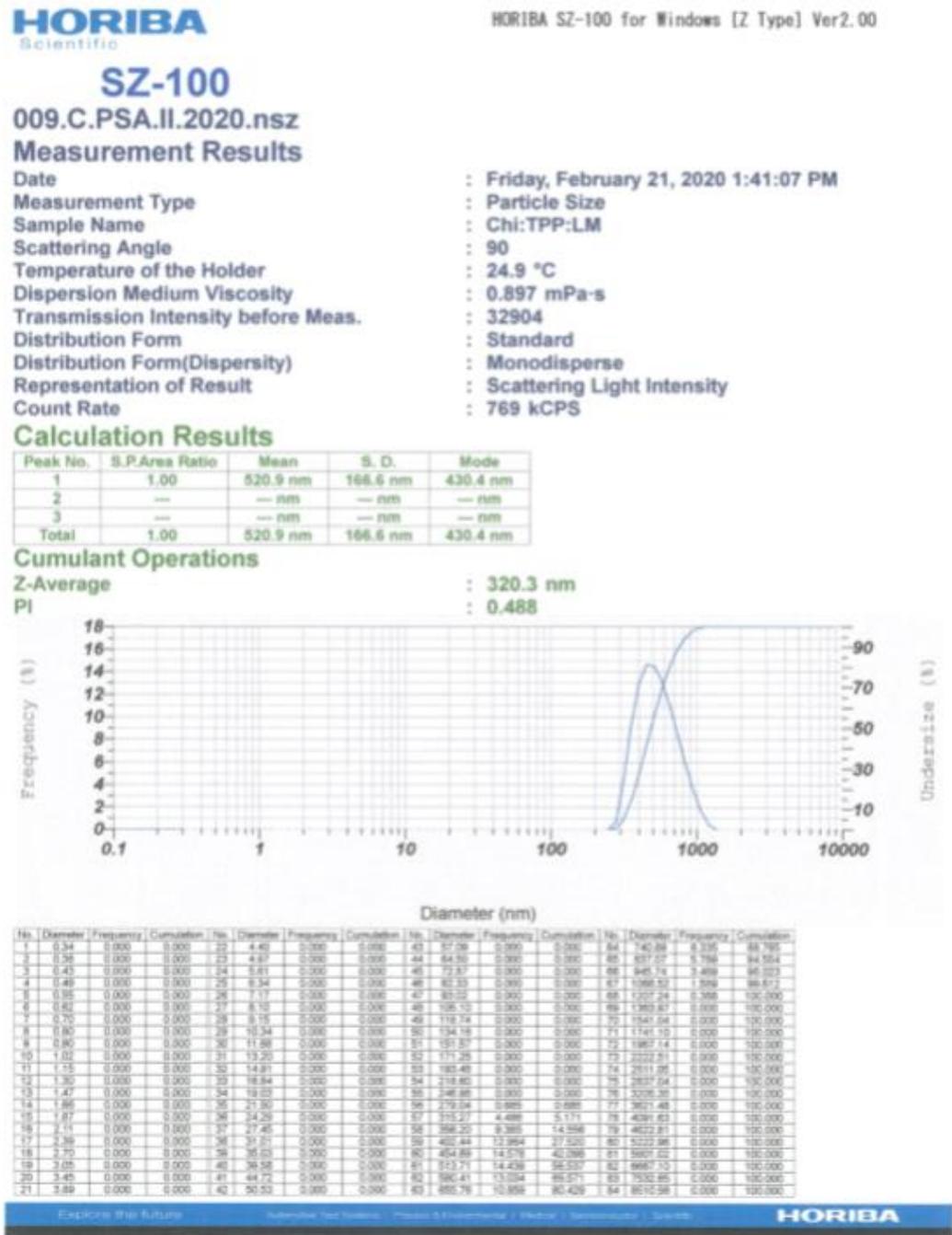
Ari Wibowo, M.Sc., Apt
 NIP. 086130404

Catatan : 1. Hasil pengujian ini hanya berlaku untuk sampel yang diuji.
 Note: These test result are only valid for the tested samples.
 2. Sertifikat ini tidak boleh diperbanyak/diundangkan tanpa izin dari Manajer Teknis Laboratorium.
 The certificate shall not be reproduced (copied) without the written permission of the Laboratory Technical Manager.

Lampiran 8. Hasil karakterisasi PSA CS/Ekstrak



Lampiran 9. Hasil karakterisasi nanoemulasi CS/TPP/Ekstrak



LAMPIRAN 10. Uji stabilitas nanoemulsi

a. Suhu ruang

Waktu Pengamatan	suhu ruang					
	Kitosan/ekstrak/NaTPP			Kitosan/ekstrak		
	pH	Bau	Keadaan	Ph	Bau	Keadaan
Minggu 0	4	Asam	Homogen	4	Asam	Homogen
Minggu 1	4	Asam	Homogen	4	Asam	Homogen
Minggu 2	4	Asam	Homogen	4	Asam	Homogen
Minggu 3	4	Asam	Homogen	4	Asam	Homogen
Minggu 4	4	Asam	Homogen	4	Asam	Homogen

b. 6 °C

Waktu Pengamatan	6 °C					
	Kitosan/ekstrak/NaTPP			Kitosan/ekstrak		
	pH	bau	Keadaan	pH	Bau	Keadaan
Minggu 0	4	Asam	Homogen	4	Asam	Homogen
Minggu 1	4	Asam	Homogen	4	Asam	Homogen
Minggu 2	4	Asam	Homogen	4	Asam	Homogen
Minggu 3	4	Asam	Homogen	4	Asam	Homogen
Minggu 4	4	Asam	Homogen	4	Asam	Homogen

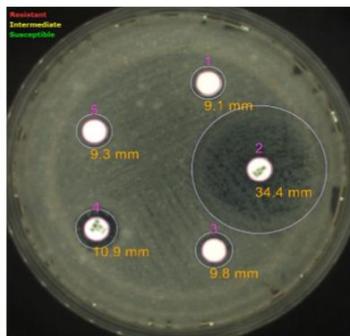
LAMPIRAN 11. Perhitungan pembuatan media uji dan pengamatan zona hambat

1. Perhitungan media MHA

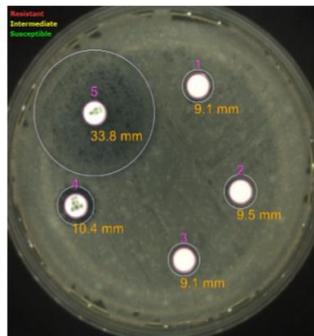
$$\begin{aligned} \frac{500 \text{ gram}}{13,1 \text{ liter}} &= \frac{x}{0,2 \text{ liter}} \\ 100 \text{ g/L} &= 13,1 \text{ L. } x \\ x &= \frac{100 \text{ g/L}}{13,1 \text{ L}} \\ x &= 7,6 \text{ g} \end{aligned}$$

2. Pengamatan zona hambat nanoemulsi CS/TPP/Ekstrak.

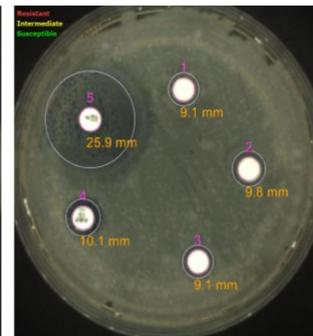
pengulangan	Diameter Zona Hambat				
	Chi-TPP-ekstrak	ampicillin (kontrol +)	eritromisin (kontrol +)	kitosan 1% (kontrol -)	penyalut (kontrol -)
1	9.1	10.4	33.8	9.1	9.5
2	9.1	10.9	34.4	9.8	9.3
3	9.1	10.1	25.9	9.1	9.8
Rata-rata	9.1	10.5	31.4	9.3	9.5



Sample analysed with SCAN 500®, version 8.0.5.0



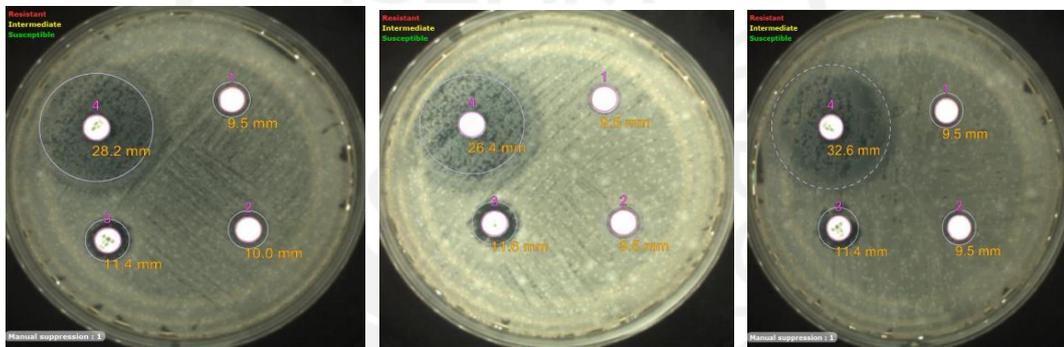
Sample analysed with SCAN 500®, version 8.0.5.0



Sample analysed with SCAN 500®, version 8.0.5.0

1. Pengamatan zona hambat nanoemulsi CS/Ekstrak

pengulangan	Diameter zona hambat			
	chitosan-ekstrak	ampicillin	eritromisin	kitosan
1	9.5	11.4	28.2	10.0
2	9.5	11.4	32.6	9.5
3	9.5	11.6	26.4	9.5
rata -rata	9.5	11.5	29.1	9.7



LAMPIRAN 12. Uji *Kruskal-Wallis* CS/TPP/Ekstrak

1. Uji normalitas CS/TPP/Ekstrak

Tests of Normality^b

perlakuan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	Df	Sig.	Statistic	df	Sig.
zona hambat ampicillin	.232	3	.	.980	3	.726
eritromisin	.363	3	.	.803	3	.121
kitosan 1%	.385	3	.	.750	3	.000
penyalut	.219	3	.	.987	3	.780

a. Lilliefors Significance Correction

b. zona hambat is constant when perlakuan = cs/tpp/ekstrak. It has been omitted.

2. Uji *Kruskal-Wallis*

Ranks

perlakuan	N	Mean Rank
zona hambat cs/tpp/ekstrak	3	3.00
ampicillin	3	11.00
eritromisin	3	14.00
kitosan 1%	3	4.83
penyalut	3	7.17
Total	15	

Test Statistics^{a,b}

Chi-Square	12.580
Df	4
Asymp. Sig.	.014

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:
perlakuan

LAMPIRAN 13. Uji *Kruskal-Waillis* CS/Ekstrak

1. Uji normalitas

perlakuan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
zona hambat ampicillin	.385	3	.	.750	3	.000
eritromisin	.274	3	.	.945	3	.546
kitosan 1%	.385	3	.	.750	3	.000

a. Lilliefors Significance Correction

b. zona hambat is constant when perlakuan = cs/ekstrak. It has been omitted.

2. Uji *Kruskal-Waillis*

perlakuan	N	Mean Rank
zona hambat cs/ekstrak	3	3.00
ampicillin	3	8.00
eritromisin	3	11.00
kitosan 1%	3	4.00
Total	12	

	zona hambat
Chi-Square	10.211
Df	3
Asymp. Sig.	.017

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:

perlakuan

LAMPIRAN 14. Uji kadar tannin

2. Larutan standar asam tanat

a. Konsentrasi 100 ppm

$$\begin{aligned}
 V_1 \cdot M_1 &= V_2 \cdot M_2 \\
 V_1 \cdot 1000 \text{ ppm} &= 50 \text{ ml} \cdot 100 \text{ ppm} \\
 V_1 &= \frac{50 \text{ ml} \cdot 100 \text{ ppm}}{1000 \text{ ppm}} \\
 V_1 &= 5 \text{ ml}
 \end{aligned}$$

b. Konsentrasi 80 ppm

$$\begin{aligned}
 V_1 \cdot M_1 &= V_2 \cdot M_2 \\
 V_1 \cdot 100 \text{ ppm} &= 10 \text{ ml} \cdot 80 \text{ ppm} \\
 V_1 &= \frac{10 \text{ ml} \cdot 80 \text{ ppm}}{100 \text{ ppm}} \\
 V_1 &= 8 \text{ ml}
 \end{aligned}$$

c. Konsentrasi 60 ppm

$$\begin{aligned}
 V_1 \cdot M_1 &= V_2 \cdot M_2 \\
 V_1 \cdot 100 \text{ ppm} &= 10 \text{ ml} \cdot 60 \text{ ppm} \\
 V_1 &= \frac{10 \text{ ml} \cdot 60 \text{ ppm}}{100 \text{ ppm}} \\
 V_1 &= 6 \text{ ml}
 \end{aligned}$$

d. Konsentrasi 40 ppm

$$\begin{aligned}
 V_1 \cdot M_1 &= V_2 \cdot M_2 \\
 V_1 \cdot 100 \text{ ppm} &= 10 \text{ ml} \cdot 40 \text{ ppm} \\
 V_1 &= \frac{10 \text{ ml} \cdot 40 \text{ ppm}}{100 \text{ ppm}} \\
 V_1 &= 4 \text{ ml}
 \end{aligned}$$

e. Konsentrasi 20 ppm

$$\begin{aligned}
 V_1 \cdot M_1 &= V_2 \cdot M_2 \\
 V_1 \cdot 100 \text{ ppm} &= 10 \text{ ml} \cdot 20 \text{ ppm} \\
 V_1 &= \frac{10 \text{ ml} \cdot 20 \text{ ppm}}{100 \text{ ml}} \\
 V_1 &= 2 \text{ ml}
 \end{aligned}$$

3. Perhitungan kadar tannin

konsentrasi (ppm)	Abs (nm)
20	0.049
40	0.114
60	0.168
80	0.227
100	0.275

Persamaan regresi yang didapatkan adalah $y = 0.0028x - 0.0029$

a. Pengulangan 1

$$y = 0.0028x - 0.0029$$

$$0,074 = 0.0028x - 0.0029$$

$$0,0769 = 0,0028x$$

$$x = 27,4643$$

b. Pengulangan 2

$$y = 0.0028x - 0.0029$$

$$0,087 = 0.0028x - 0.0029$$

$$0,0899 = 0,0028x$$

$$x = 32,1071$$

c. Pengulangan 3

$$y = 0.0028x - 0.0029$$

$$0,080 = 0.0028x - 0.0029$$

$$0,0829 = 0,0028x$$

$$x = 29,60$$