

**KARAKTERISASI SENYAWA *ANTHRAQUINONE* DARI DAUN
SELADA HIJAU (*Lactuca sativa* L.) DAN UJI AKTIVITAS
ANTIBAKTERI**

SKRIPSI

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



**Diajukan Oleh :
EVA FADILAH**

No. Mahasiswa : 17612095

**PROGRAM STUDI KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
YOGYAKARTA
2022**

**KARAKTERISASI SENYAWA ANTHRAQUINONE DARI DAUN
SELADA HIJAU (*Lactuca sativa* L.) DAN UJI AKTIVITAS
ANTIBAKTERI**

SKRIPSI

Oleh :

EVA FADILAH





No. Mahasiswa : 17612095

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

Tanggal: 17 Maret 2022

Dewan Penguji:

Tanda Tangan

1. **Dr. Habibi Hidayat., M.Si** (.....) 
2. **Dr. Nova Dilla Yanthi., M.Si** (.....) 
3. **Gani Purwiandono., Ph.D.** (.....) 
4. **Dr. Dwiwarso Rubiyanto., M.Si** (.....) 

Mengetahui,

Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Islam Indonesia



Prof. Riyanto., S.Pd., M.Si., Ph.D
NIK. 006120101

PERNYATAAN KEASLIAN TUGAS AKHIR

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Eva Fadilah

NIM : 17612095

Program Studi : Kimia

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam UII

Menyatakan bahwa skripsi dengan judul "**Karakterisasi Senyawa Anthraquinone dari Daun Selada Hijau (*Lactuca sativa* L.) dan Uji Aktivitas Antibakteri**" tidak memuat karya orang lain kecuali referensi yang telah disebutkan dalam naskah skripsi. Apabila dikemudian hari ditemukan ketidaksesuaian dengan pernyataan ini, maka saya bersedia bertanggung jawab sesuai ketentuan yang berlaku.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan sesungguhnya dan penuh tanggung jawab.

Cilegon, 16 Maret 2022

Yang menyatakan,

Eva Fadilah

PERSEMBAHAN

Dengan Mengharap Ridha Allah SWT. Tuhan Maha Pengasih, Maha Penyayang dan Maha Pemberi Kesempatan. Terimakasih tiada bandingnya, saya persembahkan Skripsi sebagai wujud penghambaan makhluk dan pemenuhan kewajiban menuntut Ilmu di Dunia.

Düiringi rasa syukur yang melimpah, saya mempersembahkan karya ini untuk Keluarga Tercinta, Bapak Ahmad Bukhaeti Hamdani (Alm), Ibu Siti Aminah (Almh), Kakak Aminullah., S.H, Kakak Eri Murniasih., S.Pd, Kakak Imat Nikmatullah, serta Kakak Vita Fatihatur Rizqiyah., S.M, manusia-manusia kuat kiriman Allah yang senantiasa mendukung segala perjalanan hidup saya sedari kecil sampai saat ini. Mereka pembawa kasih tak ternilai, pemberi tauladan, serta motivator handal yang do'anya bisa mencapai langit ke-7, sehingga saya bisa melewati proses apapun dengan usaha maksimum dan mencapai titik terbaik dari diri setiap harinya. Barakallahu lana aamiin.

Kepada dosen yang sejak awal masa perkuliahan memberikan ilmu, memfasilitasi penelitian tanpa pamrih serta penebar asa dan angan yang harus diraih, Jazakumullah khairan katsiran telah percaya kepada diri yang sangat terbatas ini. Saya persembahkan karya terbaik hasil penelitian akhir studi untuk Bapak. Dr. Habibi Hidayat., M.Si.

Benar bahwa belajar tidak hanya duduk namun juga mendengarkan. Benar juga bahwa bertindak setidaknya lebih baik daripada berbicara, teruntuk Dwi Anggraeni Sukaesih banyak kiranya cobaan terberat selama penelitian kita lewati, terimakasih atas semangat yang tiada henti dan tetap disisi untuk saling mengisi, karya ini bukan hanya pencapaian saya tapi juga pencapaian berdua.

Sayyidah Balsam: “Uhayyiika laulā burūdatul bahri, laltahabtu ilaka syauqon”.

Teringat jarak bukan hambatan untuk saling menyemangati dan bukan juga sebagai penghalang mimpi. Semoga terus membersamai dengan fikiran positifmu itu seperti selama ini Daefin Dikti., S.Kom., karyaku untukmu.

MOTTO

قُلْ هَلْ يَسْتَوِي الَّذِينَ يَعْلَمُونَ وَالَّذِينَ لَا يَعْلَمُونَ , إِنَّمَا يَتَذَكَّرُ أُولُو الْأَلْبَابِ

Katakanlah: “Adakah sama orang-orang yang mengetahui dengan orang-orang yang tidak mengetahui?” Sesungguhnya orang yang berakallah yang dapat menerima pelajaran. [QS Az-zumar/39 : 9]

مَنْ سَلَكَ طَرِيقًا يَلْتَمِسُ فِيهِ عِلْمًا سَهَّلَ اللَّهُ لَهُ بِهِ طَرِيقًا إِلَى الْجَنَّةِ

“Barangsiapa menempuh jalan untuk mencari Ilmu, maka Allah mudahkan baginya jalan menuju surga” [HR. Muslim, No. 2699]

“Maka sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan” [QS Al-Insyirah/94 : 5]

The best knowledge is that which is accompanied by Godfearingness.

[Al-Hikam; Ibnu Atha’illah al-iskandari/234]

The knowledge of anything (include medicinal chemistry), since all things have causes, is not acquired or complete unless it is known by its cause and deals with the very processes of life. [Avicenna and Paracelsus]

Mengingat sesuatu akan terus berjalan seiring waktu, apapun itu, dengan pertimbangan yang matang dan tanpa ragu, mari lakukan lebih dulu.

[Rizqi Nur Fadilah]

Enjoying this journey from Allah to Allah carefully, still, and always.

[Rizqi Nur Fadilah]

KATA PENGANTAR



Assalamu'alaikum warahmatullahi wabarakatuh.

Alhamdulillah, Lāhaulā walā quwwata illā billah segala puji bagi Allah SWT, yang mengetahui dan melihat hamba-hambanya, melimpahkan karunia dan kesehatan, memberikan petunjuk, juga kemampuan dalam menuntut ilmu. Shalawat serta salam selalu terlimpah curahkan kepada tauladan umat manusia Nabi Muhammad SAW semoga kita termasuk kedalam golongan yang diberi syafaat pada hari akhir.

Atas izin sang Maha pemberi Kemudahan, skripsi berjudul "Karakterisasi Senyawa *Anthraquinone* dari Daun Selada Hijau (*Lactuca Sativa* L.) dan Uji Aktivitas Antibakteri" ini dapat terselesaikan dengan baik dan bisa bermanfaat untuk sesama. Selama prosesnya, penulis mendapatkan bantuan juga dukungan baik secara moril maupun materil serta verbal ataupun perilaku dari banyak pihak. Sebaik-baiknya pembalas kebaikan adalah Allah SWT, namun secara khusus penulis ingin mengucapkan terimakasih kepada:

1. Keluarga (Abah, mamah, kak uyo, kak iip, bunda, kak imat, teh vita, kak juhan, teh nia, teh erni, teh uyun dan wa yanti), jasa mereka tidak pernah bisa terbalaskan dengan apapun di dunia. Semoga hal itu menjadi amalan kebaikan yang terus mengalir hingga Jannah-Nya.
2. Bapak Fathul Wahid, S.T., M.Sc., Ph.D. selaku Rektor Universitas Islam Indonesia.
3. Bapak Prof. Riyanto S.Pd., M.Si., Ph.D, selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Indonesia.
4. Ibu Prof. Dr. Is Fatimah, S.Si., M.Si, selaku Ketua Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Indonesia.
5. Bapak Dr. Dwiarso Rubiyanto, M.Si, selaku Ketua Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Indonesia

6. Bapak Dr. Habibi Hidayat, S.Pd., M.Si, selaku Dosen Pembimbing 1 yang telah memberikan motivasi, ilmu dan do'a, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan baik dan maksimal.
7. Seluruh staf akademik dan dosen Program Studi Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia yang telah membantu dalam proses pembelajaran selama menjadi mahasiswa.
8. Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI)/Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN) sebagai penyedia sarana dan prasarana dalam pelaksanaan penelitian.
9. Ibu Dr. Nova Dhillia Yanthi M.Si selaku dosen pembimbing 2 yang senantiasa sabar serta memberikan semangat kepada penulis.
10. Direktorat Sumber Daya Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset dan Teknologi (DITJEN DIKTI) yang memberikan kesempatan kepada penulis sebagai penerima program Talenta Inovasi Indonesia.
11. Rumah Sakit Paru Dr. M. Goenawan Partowidigdo selaku pihak penyedia sarana penelitian untuk *Mycobacterium Tuberculosis* H37Rv.
12. Teman-teman seperjuangan yang dengan ikhlas telah membantu dan memberikan semangat selama penelitian (Daefin, Uwi, Fathia, Dina dan Dalip) serta keluarga Kimia angkatan 2017 yang menemani hari-hari baik selama masa perkuliahan. Pelajaran yang kalian berikan tertoreh cantik dalam diri sebagai pengalaman terbaik.

Penulis menyadari masih terdapat kekurangan dalam pelaksanaan/penyusunan skripsi, oleh karenanya penulis menerima saran dan kritik dari pembaca. Lebih daripada itu, besar harapan bahwa skripsi ini dapat membantu dan memberi wawasan yang bermanfaat bagi banyak pihak. *Amiin allahumma aamin, yāā Rabbal' alamin. Wassalamu'alaikum warahmatullahi wabarakatuh.*

Cibinong, 10 Oktober 2021

Eva Fadilah

KARAKTERISASI SENYAWA *ANTHRAQUINONE* DARI DAUN SELADA HIJAU (*Lactuca sativa* L.) DAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI

INTISARI

EVA FADILAH

NIM: 17612095

Lactuca sativa L. atau daun selada hijau kriting terkonfirmasi mengandung senyawa *Anthraquinone* (AQ). Metode *freeze drying* dan maserasi dingin digunakan untuk pembuatan ekstrak dengan empat (4) variasi pelarut berbeda yaitu; Aquades, Metanol, Etanol dan Etil asetat. Ekstrak etil asetat (Ea) dari tanaman budidaya yang gemar dikonsumsi langsung ini memiliki kadar total AQ sebesar 33,974 µg/mL dimana aktifitas penghambatan radikal *1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl* (DPPH) termasuk dalam klasifikasi antioksidan kuat dengan nilai IC_{50} 43,64 µg/mL. Isolasi senyawa dilakukan menggunakan metode kromatografi kolom elusi gradien, eluen n-Heksan : Ea (10:1); (5:1); (2:1) serta Diklorometan : Metanol (5:2). Pola kromatogram senyawa AQ menghasilkan nilai RF 0,86 mengikuti RF standar teknis senyawa AQ (MERCK 98%). Interpretasi gugus fungsi instrumen FTIR menunjukkan grup karbonil identik senyawa *quinone* pada daerah $1638,32\text{ cm}^{-1}$ serta C–O *stretching* di $1385,09\text{ cm}^{-1}$. Efektifitas penghambatan pertumbuhan bakteri ditentukan dari ekstrak juga isolat konsentrasi 1000 µg/mL dan 2500 µg/mL. *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) strain H37Rv dianalisis secara *Drug Susceptibility Test* (DST) pada instrumen BACTEC MGIT 960, sedangkan uji aktivitas antimikroba dilakukan dengan metode difusi cakram terhadap bakteri *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, serta *Staphylococcus aureus*.

Kata Kunci: *Anthraquinone* (AQ), Selada Hijau kriting (*Lactuca sativa* L.), FTIR, Tuberkulosis, Bakteri Patogen, Uji Kepekaan Obat (DST).

ANTHRAQUINONE CHARACTERIZATION FROM CURLY GREEN LETTUCE (*Lactuca sativa* L.) WITH ANTIMICROBIAL ACTIVITY AGAINST DIFFERENT PATHOGENS

ABSTRACT

EVA FADILAH

NIM: 17612095

Lactuca sativa L. or curly green lettuce has been confirmed to contain anthraquinone (AQ) derivatives. Freeze drying and cold maceration methods were used to make extracts with four (4) different solvent variations; Aquades, Methanol, Ethanol and Ethyl acetate. The ethyl acetate (Ea) extract from this cultivated plant has a total AQ level 33,974 µg/mL with radical inhibitory activity of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl calculated IC₅₀ value 43.64 µg/mL that classified as a strong antioxidant. Gradient elution column chromatography method, for n-Hexane : Ea (10:1); (5:1); (2:1) and Dichloromethane: Methanol (5:2) as eluent separated the compound spesifically. The chromatogram pattern resulted in RF value 0.86 which was in accordance with the RF value technical standard of AQ (MERCK 98%). Functional group interpretation from FTIR instrument showed identical carbonyl groups in quinone at 1638.32 cm⁻¹ and C–O stretching at 1385.09 cm⁻¹. The effectiveness inhibition was determined from the extracts and isolates concentration in 2500 µg/mL and 1000 µg/mL. *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) strain H37Rv analysis based on the Drug Susceptibility Test (DST) with BACTEC MGIT 960 instrument, then agar diffusion identification applied to some patogens there are *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus*.

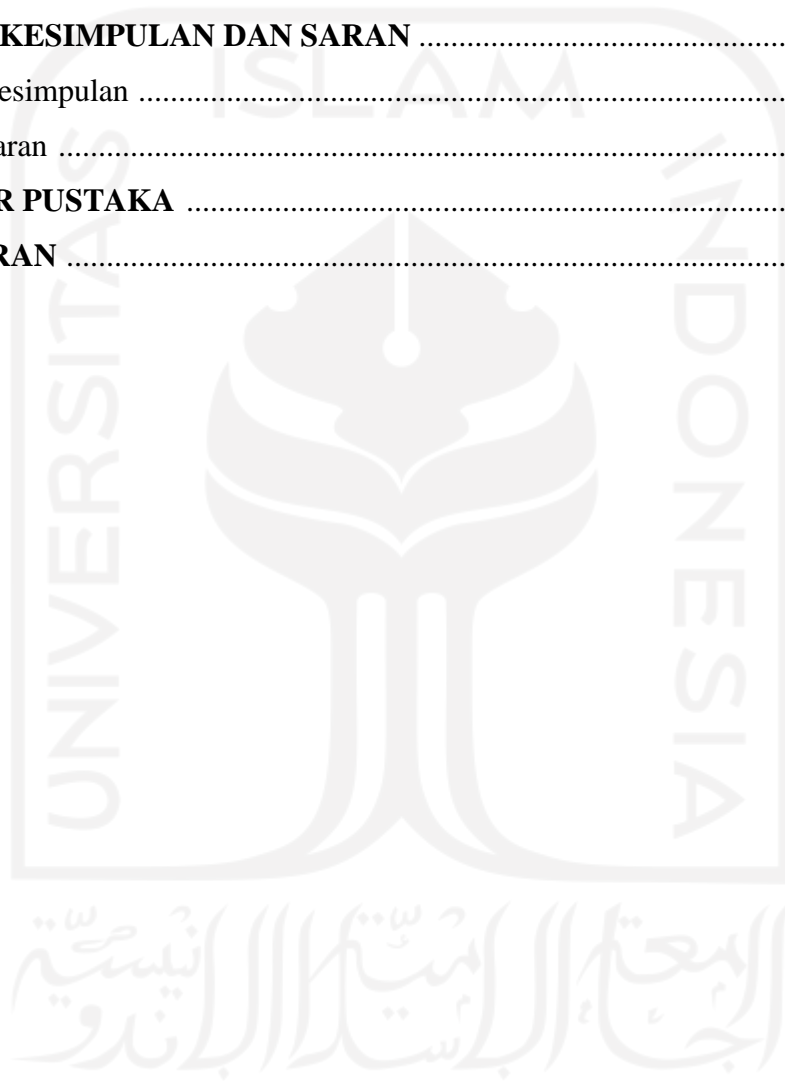
Keywords: Anthraquinone (AQ), Curly Green Lettuce (*Lactuca sativa* L.), FTIR, Tuberculosis, Pathogenic Bacteria, Drug Susceptibility Test (DST)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN KEASLIAN TUGAS AKHIR	iii
PERSEMBAHAN	iv
MOTTO	v
KATA PENGANTAR	vi
INTISARI	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR TABEL	xv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	4
1.3. Tujuan Penelitian.....	4
1.4. Manfaat Penelitian.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. Pemanfaatan Daun Selada Hijau (<i>Lactuca sativa</i> L.).....	5
2.2. Aplikasi Senyawa Turunan <i>Anthraquinone</i> (AQ) sebagai Antibakteri.....	6
2.3. Hipotesis	8
BAB III DASAR TEORI	9
3.1. Daun Selada Hijau (<i>Lactuca sativa</i> L.)	9
3.2. <i>Anthraquinone</i> (AQ).....	11
3.3. Tuberkulosis	13
3.4. Pneumonia	16
3.5. Infeksi Aliran Darah	17
3.6. Ekstraksi	18

3.7. Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Daun Selada Hijau (<i>Lactuca sativa</i> L.)	20
3.8. Metode DPPH	21
3.9. Isolasi Bahan Alam	21
3.10. Spektrofotometer UV-VIS	28
3.11. <i>Fourier Transform Infra-Red</i> (FTIR)	31
3.12. Uji Kepekaan Senyawa Anthraquinone	34
BAB IV METODE PENELITIAN	36
4.1. Alat	36
4.2. Bahan	36
4.3. Cara Kerja	37
4.3.1. Preparasi Sampel Ekstrak Daun Selada Hijau (<i>Lactuca sativa</i> L.)	37
4.3.2. Identifikasi Ekstrak Selada (<i>Lactuca sativa</i> L.)	38
4.3.3. Penentuan Kadar <i>Anthraquinone</i> (AQ) dengan Metode Kalibrasi Standar	39
4.3.4. Uji Daya Antioksidan dengan DPPH	39
4.3.5. Isolasi <i>Anthraquinone</i> (AQ) dari Ekstrak Daun Selada Hijau (<i>Lactuca sativa</i> L.)	40
4.3.6. Penentuan <i>Anthraquinone</i> (AQ) menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)	41
4.3.7. Penentuan Struktur <i>Anthraquinone</i> (AQ) terkonfirmasi <i>Fourier Transform Infra Red</i> (FTIR)	42
4.3.8. <i>Anthraquinone</i> (AQ) sebagai Antibakteri	43
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN	46
5.1. Daun Selada Hijau (<i>Lactuca Sativa</i> L.)	46
5.2. Ekstraksi Daun Selada Hijau (<i>Lactuca Sativa</i> L.)	48
5.3. Identifikasi Ekstrak Daun Selada Hijau (<i>Lactuca Sativa</i> L.)	49
5.4. Metode Kalibrasi Standar <i>Anthraquinone</i> (AQ)	52
5.5. Analisis Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etil Asetat (Ea)	55

5.6. Isolasi Senyawa <i>Anthraquinone</i> (AQ) dari Ekstrak Etil Asetat (Ea)	58
5.7. Karakterisasi Senyawa <i>Anthraquinone</i> (AQ) Isolat Etil Asetat (Ea)	63
5.8. Aktivitas Antibakteri Senyawa <i>Anthraquinone</i> (AQ) Daun Selada Hijau (<i>Lactuca sativa</i> L.)	66
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	76
6.1. Kesimpulan	76
6.2. Saran	76
DAFTAR PUSTAKA	77
LAMPIRAN	89



DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. (A) Daun selada hijau ; (B) Daun selada hijau pada Salad	9
Gambar 2. Struktur umum <i>Anthraquinone</i> (AQ)	11
Gambar 3. Turunan senyawa <i>Anthraquinone</i> (AQ)	12
Gambar 4. Siklus penularan MTB	14
Gambar 5. <i>Incubated orbital shaker</i>	20
Gambar 6. (a) KLT sebelum elusi (b) KLT setelah elusi	23
Gambar 7. Faktor reterdasi pada KLT	23
Gambar 8. Proses elusi kromatografi kolom	24
Gambar 9. Instrumen KCKT	25
Gambar 10. Skema Spektrofotometer UV-VIS	29
Gambar 11. Skema Spektroskopi FTIR	33
Gambar 12. Diagram perubahan fase air	47
Gambar 13. Reaksi 1,8- <i>Dihydroxyanthraquinone</i> menjadi anion fenolat.....	51
Gambar 14. Struktur <i>anthrone</i> dan <i>dianthrone</i>	51
Gambar 15. Spektra Panjang gelombang maksimum standar AQ	53
Gambar 16. Spektra Absorbansi vs Konsentrasi	54
Gambar 17. Spektra Panjang gelombang maksimum DPPH	56
Gambar 18. Spektra % Inhibisi vs Konsentrasi	57
Gambar 19. Kromatogram KLT optimasi eluen.....	59
Gambar 20. Kromatogram fraksi kolom	61
Gambar 21. Kromatogram senyawa AQ	62
Gambar 22. Kurva kalibrasi <i>anthraquinone</i> (AQ)	63
Gambar 23. Kromatogram standar teknis AQ dan sampel	65
Gambar 24. Spektra FTIR Isolat Ea	66
Gambar 25. Interpretasi struktur AQ	67
Gambar 26. Hasil uji sterilisasi stok	68
Gambar 27. Kurva uji antibakteri <i>K. pneumoniae</i>	73

Gambar 28. Kurva uji antibakteri *S. pyogenes* 74
Gambar 29. Kurva uji antibakteri *S. aureus* 75
Gambar 30. Kurva uji antibakteri *E. coli* 76



DAFTAR TABEL

Tabel 1. Turunan AQ Tanaman antibakteri.....	8
Tabel 2. Ringkasan kandungan kimia selada hijau	10
Tabel 3. Pengelompokan OAT.....	15
Tabel 4. Karakteristik detektor KCKT	27
Tabel 5. Daerah serapan Inframerah	33
Tabel 6. Hasil identifikasi <i>anthraquinone</i> (AQ)	50
Tabel 7. Kadar ekstrak selada hijau.....	54
Tabel 8. Hasil aktivitas antioksidan DPPH	57
Tabel 9. Hasil kadar isolat AQ	64
Tabel 10. Interpretasi gugus fungsi senyawa AQ	65
Tabel 11. Data OAT Scanning BACTEC 960	69
Tabel 12. Hasil uji senyawa AQ sebagai Anti-TB	70

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Peningkatan penyebab kematian dari penyakit infeksi atas populasi manusia di dunia, salah satunya yaitu Tuberkulosis (TB). Indonesia termasuk negara kedua (14%) dengan beban epidemi TB terbanyak setelah India (41%) kemudian disusul oleh Filipina (12%) dan China (8%) (WHO, 2021). Sejak *re-emerging* COVID-19 yang kenyataannya sangat menimpali penyakit ini, KONAS XVI Perhimpunan Dokter Paru Indonesia (PDPI) menyatakan penanganan pasien TB menurun menjadi 42% meskipun penemuan bentuk kasus baru diestimasikan mencapai 845.000 (Nadia, 2021). Terdapat 92.700 orang meninggal karena TB atau sekitar 11 orang meninggal perjamnya karena keganasan penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) (Kemenkes, 2020). Permasalahan terkait yang muncul dan bisa lebih berbahaya yaitu karena adanya *Multi Drug Resistant Tuberculosis* (MDR-TB), keadaan dimana pasien TB aktif resistan dan mengalami efek hepatotoksik terhadap minimal 2 obat anti-tuberkulosis (OAT) seperti Isoniazid, Rifampisin hingga golongan obat baru *Floroquinolone* (Bijawati dkk, 2018).

Penyakit infeksi lainnya melibatkan beberapa bakteri berbeda sebagai penyebab utama dan mengalami resistensi antibiotik. Bakteri *Klebsiella pneumoniae* mengakibatkan penyakit pneumonia atau radang paru-paru akut (Kazimoto *et al*, 2018), antibiotik carbapenem tidak bereaksi pada setengah dari jumlah pasien yang terinfeksi. Selain itu, faringitis, *rheumatic heart disease* (RHD) hingga pneumonia bisa disebabkan oleh bakteri yang sangat umum hidup dalam tubuh manusia yakni *Streptococcus pyogenes*, Savitri, dkk (2019) mengkonfirmasi 500.000 angka kematian setiap tahun, dan terdapat kasus resistensi antibiotik karena bakteri yang terus berevolusi (Fair dan Tor, 2014). Menurut *World Health Organization* (WHO) dalam *World Health Statistics 2021*, Resistensi antimikroba juga terjadi pada infeksi aliran darah yang disebabkan oleh bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*

terhadap antibiotik sefalosporin gol. III serta metisilin dengan tingkat kematian mencapai 64%. Mengatasi hal tersebut, pengobatan terapi komplementer dan alternatif bisa berguna sebagai perlakuan pendukung. Beberapa penelitian perlu dilakukan guna membuktikan studi pengembangan senyawa antibakteri dari keberadaan tanaman herbal kaya flavonoid serta glikosida yang lebih khusus akan dijadikan sebagai antibiotik.

Anthraquinones (AQ) disebut dengan *anthracenedione* atau *9,10-dioxoanthracenes* merupakan variasi struktural kuinon bersifat polar dari senyawa metabolit sekunder kelompok glikosida dan memiliki aktifitas antibakteri, antivirus serta antiparasit. *Anthraquinone* (AQ) pada tumbuhan diproduksi dalam bentuk bebas atau sebagai glikosida, pembentukan glikosida terjadi ketika satu atau lebih molekul gula *rhamnose* ($C_6H_{12}O_5$) terikat ke aglikon oleh ikatan O-glikosida melalui gugus hidroksil (Fouillaud *et al*, 2018). Balachandran *et al* (2016) mengkonfirmasi bahwa *2-hydroxy-9,10-anthraquinone* merupakan senyawa yang menghambat pertumbuhan sel dari bakteri gram positif *Staphylococcus aureus* dan bakteri gram negatif *Klebsiella pneumoniae* serta sebagai antibakteri dengan nilai konsentrasi hambat minimum lebih dari 100 $\mu\text{g/mL}$ dan 50 $\mu\text{g/mL}$. Mengacu pada Fouillaud *et al* (2018), AQ terdapat di berbagai famili tumbuhan dengan kadar yang dominan ataupun rendah dan bisa ditemukan seperti pada *liliaceae*, *polygonaceae*, *rhamnaceae*, *cesalpiniciae* juga *asteraceae* dalam spesies *Lactuca sativa* L. atau daun selada hijau (selada kriting).

Daun selada hijau berbentuk bulat panjang, berombak dengan tepi bergerigi. Tanaman ini termasuk salah satu jenis sayuran budidaya dan gemar dikonsumsi oleh masyarakat umum karena mengandung vitamin juga mineral esensial yang baik bagi kesehatan. Selada hijau banyak mengandung antioksidan seperti betakarotin, falat, lutein serta indol berguna sebagai perlindungan diri untuk menghindari kanker. Dalam bidang kimia selada hijau digunakan sebagai senyawa penuntun (*lead compound*) obat dengan indikasi terapeutik tertentu seperti anti-inflamasi dan antibakteri (Bartnik dan Facey, 2017). Noumedem, *et al* (2013) dalam penelitiannya tentang ekstrak metanol daun selada hijau (*Lactuca sativa* L.) sebagai solusi dari resistensi antibiotik terhadap

28 bakteri gram negatif termasuk *K. pneumoniae* juga *E. coli*, aktivitas antibakteri dihasilkan pada nilai konsentrasi hambat minimum (MIC) dengan rentang 256 – 1024 µg/mL. Secara umum, komponen senyawa daun selada hijau (*Lactuca sativa* L.) terdiri dari lipid, saponin, triterpenoid, mineral, dan flavonol. Penelitian ini bertujuan mengkonfirmasi senyawa turunan glikosida dari grup *anthraquinone* (AQ) daun selada hijau (*Lactuca sativa* L.) serta uji aktivitasnya terhadap berbagai bakteri patogen.

Pelarut ekstraksi yang sering dan aman digunakan secara komersial mengacu pada peraturan mutlak (UE) No.1907/2006 (diikuti seluruh negara) untuk mendapatkan senyawa dari tanaman tertentu diantaranya yaitu air; metanol; etanol; dan etil asetat. Seluruh pelarut ini disesuaikan dengan senyawa yang akan diekstraksi mengikuti prinsip *like dissolve like*. Jika senyawa yang akan dilarutkan merupakan senyawa polar, maka pelarut yang digunakan adalah pelarut polar begitupun untuk senyawa nonpolar, beberapa pelarut universal bisa melarutkan kedua senyawa secara bersamaan. Pelarut untuk memisahkan senyawa AQ adalah metanol (Sindora, dkk 2017). Namun daripada itu, hasil studi Insanu *et al* (2019) memperoleh AQ alami dari ekstrak etil asetat.

Dalam penelitian “Karakterisasi Senyawa *Anthraquinone* dari Daun Selada Hijau (*Lactuca sativa* L.) dan Uji Aktivitas Antibakteri”, senyawa AQ diisolasi menggunakan metode Kromatografi kolom. Fraksi hasil kemudian kembali dipisahkan dengan plat Kromatografi lapis tipis (KLT). Proses identifikasi senyawa dilakukan secara kualitatif berdasarkan analisis keberadaan jenis metabolit sekunder tanaman dari metode Borntreger juga Borntreger modifikasi. Sebelum isolasi senyawa, optimasi kadar AQ dari ekstrak maserasi dingin dihitung atas persamaan kurva kalibrasi standar dan diuji daya antioksidan dengan menentukan % inhibisi radikal DPPH secara spektrofotometri. Tahap karakterisasi AQ meliputi 2 hal yakni analisis kadar isolat menggunakan instrumen Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT), kemudian dugaan gugus fungsi senyawa turunan AQ diidentifikasi dengan instrumen *Fourier Transform Infra Red* (FTIR). Isolat yang terkonfirmasi memiliki senyawa turunan AQ diaplikasikan pada *Mycobacterium Tuberculosis* (MTB) strain H37Rv kemudian diamati penghambatannya selama empat belas (14) hari dengan pemeriksaan *drug*

susceptibility test (DST) pada instrumen BACTEC MGIT 960. Selain itu, pemeriksaan difusi cakram juga dilakukan selama 24 jam terhadap bakteri *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, serta *Streptococcus pyogenes*.

1.2. Rumusan Masalah

1. Bagaimana hasil isolasi senyawa turunan *Anthraquinone* (AQ) dari daun selada hijau (*Lactuca sativa* L.).
2. Bagaimana karakterisasi senyawa turunan *Anthraquinone* (AQ) daun selada hijau (*Lactuca sativa* L.).
3. Bagaimana aktivitas antibakteri senyawa turunan *Anthraquinone* (AQ) terhadap *Mycobacterium Tuberculosis* (MTB) strain H37Rv; *K. pneumoniae*; *E. Coli*; *S. aureus*; serta *S. pyogenes*.

1.3. Tujuan Penelitian

1. Mendapatkan hasil isolasi senyawa turunan *Anthraquinone* (AQ) dari daun selada hijau (*Lactuca sativa* L.).
2. Mengetahui hasil karakterisasi senyawa turunan *Anthraquinone* (AQ) daun selada hijau (*Lactuca sativa* L.).
3. Mengetahui aktivitas antibakteri senyawa turunan *Anthraquinone* (AQ) dari daun selada hijau (*Lactuca sativa* L.) terhadap pertumbuhan bakteri *Mycobacterium Tuberculosis* (MTB) strain H37Rv; *K. pneumoniae*; *E. Coli*; *S. aureus*; serta *S. pyogenes*.

1.4. Manfaat Penelitian

Manfaat yang diharapkan dalam penelitian ini adalah daun selada hijau dapat dijadikan sebagai salah satu herbal pendamping karena mengandung senyawa turunan *Anthraquinone* (AQ) yang bisa menghambat pertumbuhan bakteri *Mycobacterium Tuberculosis* (MTB) strain H37Rv; *K. pneumoniae*; *E. Coli*; *S. Aureus*; serta *S. pyogenes*. Selain itu, AQ bisa dijadikan senyawa penuntun (*lead compound*) untuk studi lanjutan antibiotik dalam mengatasi permasalahan resistensi antimikroba.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Pemanfaatan Daun Selada Hijau (*Lactuca sativa* L.)

Lactuca sativa L. adalah nama ilmiah dari tanaman selada hijau mengikuti peraturan internasional tata nama zoologi. Masyarakat Indonesia memanfaatkan daun selada hijau sebagai sayuran pendamping lauk (lalapan) serta pelengkap salad yang dikonsumsi secara langsung tanpa proses pemasakan tertentu. Dalam bidang medisinal selama dua tahun terakhir, aktivitas antioksidan famili tanaman selada telah dilaporkan dapat mencegah penyakit kronis berhubungan dengan tingginya daya sitotoksik terhadap sel kanker (Rohmah dan Wulandari, 2019). Tidak hanya itu, menurut penelitian yang telah dilakukan Gyawali *et al* (2020), ekstrak daun selada hijau dimanfaatkan untuk mengurangi peradangan dan kecemasan. Sebagai anti-inflamasi dan ansiolitik, ekstrak metanolnya dapat memberikan efek penghambatan yang optimum pada respon nonsisepatif.

Memiliki banyak sebutan termasuk Selada kriting, jenis sayuran ini mengandung berbagai turunan senyawa dari golongan flavonoid yang efektif sebagai agen antibakteri. Senyawa kimia seperti garam perak dari daun *Lactuca sativa* L. digunakan dalam sintesis nanopartikel perak untuk dievaluasi pada *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, dan isolat klinis *Klebsiella pneumoniae*. Penelitian yang dilakukan Nazri, Adnan dan Mohamad (2011) menunjukkan aktivitas antibakteri dari keseluruhan bakteri tersebut memiliki diameter zona hambat (IZ) antara 10 dan 12 mm. Selain itu, ekstrak metanol daun selada telah terbukti memiliki sifat antibakteri yang signifikan terhadap isolat klinis *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, dan *Pseudomonas aeruginosa* (nilai IZ: 11,50–14 mm); sedangkan ekstrak air hanya aktif melawan bakteri *Bacillus subtilis* dan *Escherichia coli*.

Aktivitas antibakteri metanol dan ekstrak air daun selada hijau ditentukan dalam penelitian yang telah dilakukan Edziri, *et al* (2011) terhadap bakteri gram negatif dan gram positif menggunakan uji mikrodilusi. Bakteri gram-negatif termasuk diantaranya adalah satu strain *E. coli* ATCC25922 serta isolat klinis *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, dan *Acinetobacter baumannii* sedangkan bakteri gram positif meliputi *B. subtilis* ATCC 6633, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, dan isolat klinis *S. aureus*, *Enterococcus faecium*, juga *Corynebacterium spp.* Penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak metanol memiliki aktivitas antibakteri yang lebih baik dengan konsentrasi hambat minimum (MIC) 2,5 µg/mL terhadap semua bakteri yang diuji. Ekstrak air memiliki nilai MIC 5 µg/mL terhadap semua bakteri gram negatif dan 2,5 µg/mL melawan bakteri gram positif. Al-khajrazi dan Rasheed (2019) juga melakukan penelitian terkait aktivitas antibakteri ekstrak daun selada hijau pada bakteri gram positif yaitu *Staphylococcus aureus* serta bakteri gram negatif *Escherichia coli*, hasilnya diperoleh diameter zona hambat sebesar 19 mm dan 20 mm.

2.2 Aplikasi Senyawa Turunan Anthraquinone (AQ) sebagai Antibakteri

Anthraquinone (AQ) adalah senyawa glikosida dari berbagai tanaman yang biasa berperan sebagai pewarna alami. Tidak hanya itu, beragam tanaman dengan kandungan AQ efektif untuk menghambat pertumbuhan bakteri atau sebagai agen antibakteri. Pohon jati, bukan hanya dimanfaatkan sebagai kebutuhan papan semata, Penelitian Priambodo dkk (2018), mengungkapkan daun jati bisa berfungsi sebagai antituberkulosis. Secara invitro dengan metode dilusi cair pada media Middlebrook 7H9 diperoleh nilai MIC MTB pada 400 µg/mL, indikasi senyawa yang berperan yaitu fenolik dan glikosida AQ. Menurut Rajin (2019), aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol, ekstrak etil asetat dan ekstrak air aloe vera atas pengamatan media Lowenstein Jensen untuk bakteri MTB strain H37Rv ditunjukkan hasilnya dari % hambatan ekstrak etanol yaitu 100% pada konsentrasi 50 mg/mL; ekstrak etil asetat 100% pada konsentrasi 25 mg/mL; serta ekstrak air 100% pada konsentrasi 100 mg/mL. Tahun

2020, hasil penelitian dari Rahim dan Mourisa menyatakan ekstrak etanol kulit lidah buaya mengandung AQ dan dapat menghambat pertumbuhan bakteri resisten tertinggi (62,24%) yaitu *Escherichia coli* dengan zona inhibisi sebesar 16,08 mm. Kaya akan efek farmakologis, Pramesthi dkk (2020) menguji aktivitas antibakteri ekstrak yang sama terhadap *extended spectrum beta-laktamase* dari *Escherichia coli* dan *Klebsiella pneumonia* yang resisten terhadap antibiotik beta laktam, konsentrasi hambat minimum terhadap keduanya optimum pada nilai 80% atau 8 g/mL.

Buah mengkudu (*Morinda citrifolia* Linn) sering dikonsumsi sebagai rujak. Tanaman yang termasuk kedalam famili *rubiaceae* ini memiliki sifat sebagai antibakteri karena keberadaan senyawa turunan AQ, Mauliku *et al* (2017) menganalisis besar dosis ekstrak kasar etanol dan senyawa AQ terhadap MTB strain H37Rv. Nilai konsentrasi hambat minimum dimulai dari 40 µg/mL. Sebelumnya, Srinivasan dan Durairaj (2014) melalui metode difusi cakram juga menemukan aktivitas antibakteri dari ekstrak hidroetanol terhadap bakteri *Klebsiella pneumoniae* pada konsentrasi 100 µg/mL dengan zona inhibisi 11 mm. Senyawa dominan yang berperan yaitu alizarin.

Di Asia, secara tradisional tanaman Bawang Dayak yaitu *Eleutherine Americana* Merr. famili *Iridaceae* dikonsumsi sebagai pengobatan untuk diabetes dan antihipertensi. Tanaman ini memiliki aktivitas antibakteri yang optimum karena keberadaan senyawa AQ dibuktikan oleh Insanu *et al* (2014) dari aktivitas penghambatan ekstrak etanol terhadap bakteri gram positif *Staphylococcus aureus* ATCC 23235 dan 27664, dan *Streptococcus pyogenes*. Nilai konsentrasi hambat minimum ada pada rentang konsentrasi 250 – 1000 ppm. Dalam studi terkait, senyawa AQ juga mampu menghambat pertumbuhan *methicillin resistant Staphylococcus aureus* (MRSA). Di tahun yang sama Wei *et al* mendapatkan turunan senyawa AQ yaitu 1,8-dihydroxy-anthraquinone dari *Porphyra haitanensis*, dengan kemampuan antibakteri yang kuat atas pengamatan dinding sel *Staphylococcus aureus* pada instrumen *scanning electron microscope* (SEM) dan *transmission electron microscope* (TEM). Hasil kedua mikroskop berkorelasi, pada MIC sebesar 80 ppm terjadi deformasi dinding sel dan agregasi antar sesamanya sehingga bakteri lisis dan

mati pada inkubasi selama tujuh (7) jam. Penelitian terbaru dari Ramadhan, *et al* (2021) senyawa Alizarin dari daun sembukan efektif menghambat *Staphylococcus aureus* hanya dengan MIC 9,37 ppm.

Tabel 1. Turunan AQ sebagai Antibakteri

Jenis tanaman	Senyawa turunan Anthraquinone (AQ)	Bentuk sediaan	Aktivitas antibakteri
<i>Tectona grandis</i> (daun jati)	- <i>Emodin</i> - <i>Physcion</i>	Ekstrak etil asetat	- MTB H37Rv
Lidah buaya	- <i>Aloe-emodin</i> - <i>Aloin A dan B</i> - <i>Chrysophanol</i>	Ekstrak etil asetat, Gel aloe vera, dan ekstrak etanol	- <i>Escherichia coli</i> - <i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Morinda citrifolia</i> Linn (buah mengkudu)	- <i>Alizarin</i>	Ekstrak etanol, dan ekstrak hidroetanol	- MTB H37Rv - <i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Eleutherine Americana</i> Merr (bawang Dayak)	- <i>Eleuthraquinone A;B</i> - <i>1,5-dihydroxy-3 methyl-anthraquinone</i>	Ekstrak etanol	- <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Paederia foetida</i> (daun sembukan)	- <i>Alizarin</i> - <i>1,3-dihydroxy anthraquinone</i>	Isolat ekstrak metanol	<i>Staphylococcus aureus</i>

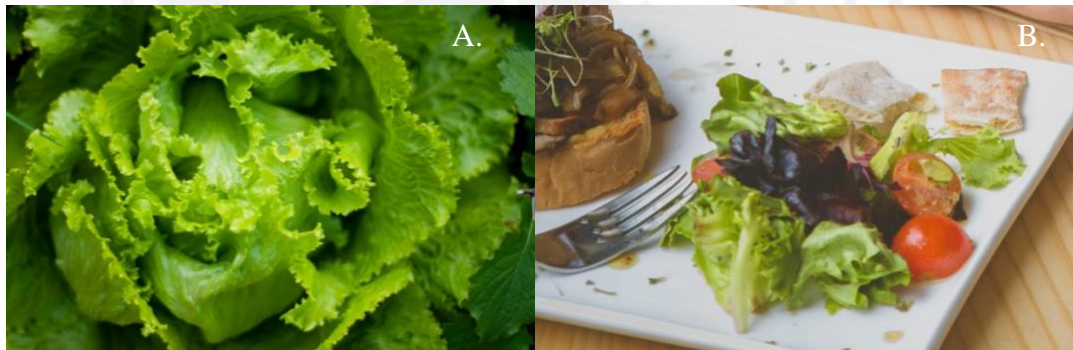
2.3 Hipotesis

Isolasi senyawa turunan *anthraquinone* (AQ) dari daun selada hijau (*Lactuca sativa* L.) dengan modifikasi sediaan ekstrak atas variasi pelarut yang digunakan dapat terkonfirmasi dan dijadikan sebagai herbal pendamping obat juga senyawa penuntun (*lead compound*) dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen terutama: MTB H37Rv; *K. pneumoniae*; *E. coli*; *S. aureus*; serta *S. pyogenes*.

BAB III DASAR TEORI

3.1. Daun Selada Hijau (*Lactuca sativa* L.)

Selada hijau (*Lactuca sativa* L.) merupakan salah satu komoditi hortikultura di Indonesia. Sayuran ini populer dan banyak diminati terutama sebagai komponen pelengkap salad dengan gizi yang cukup tinggi yaitu dalam 100 g selada terkandung energi 15 kalori, karbohidrat 2,87 g, protein 1,36 g dan lemak 0,15 g (*USDA National Nutrient Data Base*, 2018).



Gambar 1. (A) Daun selada hijau; (B) Daun selada hijau pada salad

Selada hijau tumbuh di daerah dataran tinggi beriklim lembab termasuk tanaman semusim *herbaceous* (banyak mengandung air) (Siagian, 2018). Daun selada berbentuk bulat panjang berukuran besar dengan bagian tepi daun bergerigi (keriting) serta memiliki tulang daun yang menyirip, bersifat kuat juga halus. Menurut Saparianto (2013) klasifikasi selada hijau dalam sistematika taksonomi adalah sebagai berikut;

Kingdom : Plantae
Super Divisi : Spermathophyta
Divisi : Magnoliophyta
Kelas : Magnoliposida
Ordo : Asterales

Famili : Asteraceae
 Genus : Lactuca
 Species : *Lactuca sativa* L.

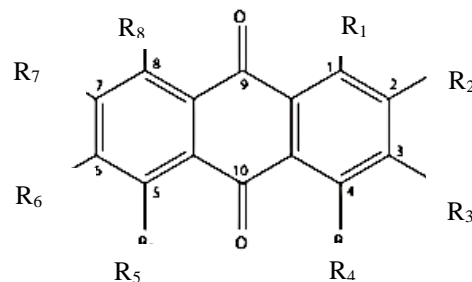
Berdasarkan sifat-sifat kimia pada tanaman, tingkat keasaman (pH) daun selada ideal berkisar antara 6,5 - 7 mengikuti kadar keasaman tanah tempat tumbuh, daun selada memiliki kandungan senyawa antioksidan dan polifenol seperti Vitamin A, Vitamin B, terutama Vitamin C (Materska, *et al.*, 2018). Mengacu pada Sayyah (2004), Xu (2012), Noumedem (2017), dan Sularz (2020), kandungan kimia pada selada hijau (*Lactuca sativa* L.) dicantumkan pada **tabel 2**.

Tabel 2. Ringkasan kandungan kimia selada hijau

Kelas	Senyawa
Lipid	Asam miristat, asam palmitat, asam stearat, asam oleat, asam linoleat, asam lignoserat, dan asam palmitoleate
Mineral	Fosfor, kalium, kalsium, magnesium, litium, aluminium, vanadium, cadmium, zink, mangan, besi, natrium, sulfur, tembaga, dan barium
Terpenoid	<i>1b-O-β-D-glucopyranosyl-4a-hydroxyl-5a,6b, 11bH-eudesma-12, 6a-olide and 1b-hydroxyl-15-O-(p-methoxy-phenylacetyl)-5a,6b; 11bH-eudesma-3-en-12,6a-olide</i>
Flavonol glukosida	<i>3,3',4',5,9,10-hexahydroxy-12-methylchroman[2,3]flavon 3-O-β-D-glucopyranoside</i> atau <i>Lactucasativosida, japonicin, isoquercitrin</i> , serta asam kafeat

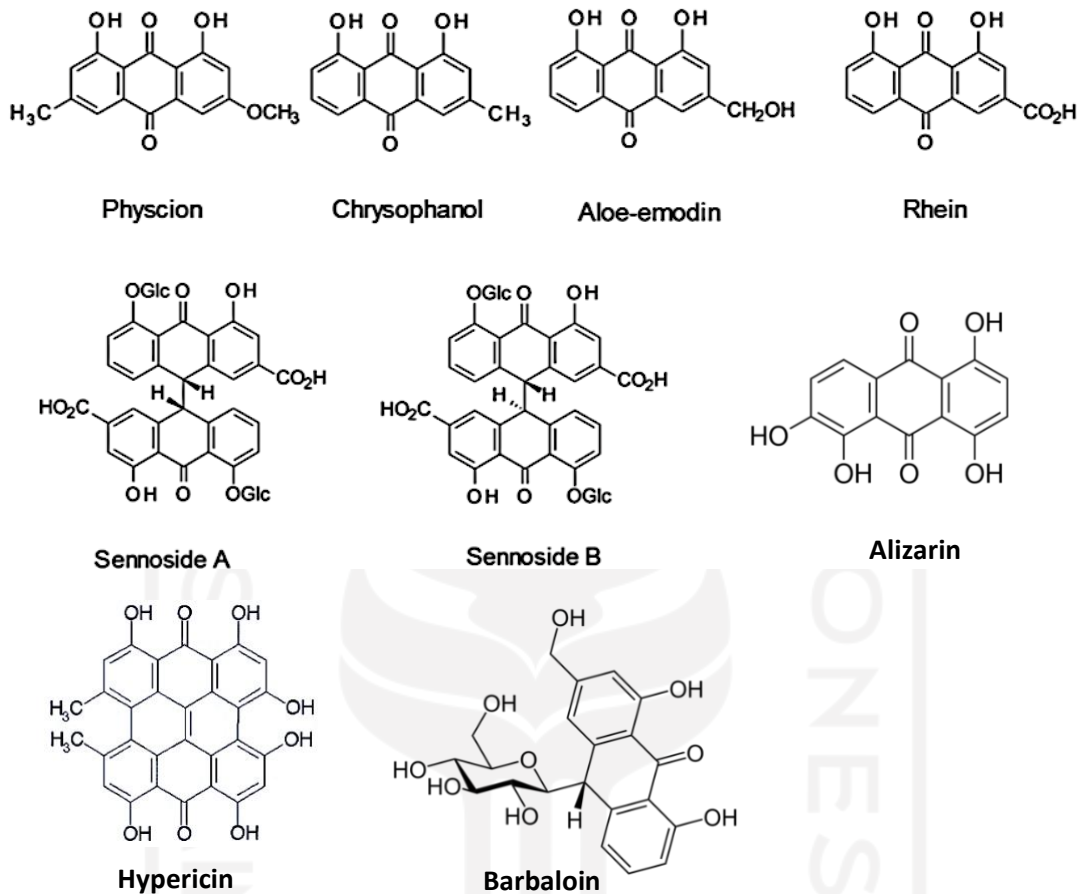
3.2. Anthraquinone (AQ)

Anthraquinone (AQ) adalah salah satu klasifikasi glikosida berdasarkan aglikon dari senyawa metabolit sekunder suatu tanaman (Julianto, 2019). Senyawa AQ beserta turunannya larut dalam air panas atau alkohol serta dapat diekstraksi dengan penambahan basa karena mengandung gugus karboksilat (Fitriyanawati, 2017). Secara struktur AQ terkait dengan *anthracene* dan memiliki inti *9,10-anthracenedione* dengan gugus fungsi berbeda seperti -OH, -CH₃, -OCH₃, -CH₂OH, -CHO, -COOH pada posisi yang juga berbeda dan terkadang disebut sebagai *9,10-dioxoanthracene* (Simpson dan Amos, 2017). Glikosida AQ terbentuk ketika satu atau lebih molekul gula, sebagian besar glukosa atau ramnosa, terikat ke aglikon oleh ikatan O-glikosida melalui gugus hidroksil. Menurut Simpson dan Amos (2017), biosintesis AQ bisa dilakukan melalui jalur (asetat-malonat) poliketida.



Gambar 2. Struktur umum *Anthraquinone* (AQ)

Pada tumbuhan tingkat tinggi, turunan AQ ditemukan di berbagai spesies terutama pada spesies *Rheum*, *Rumex*, *Rhamnus*, *Aloe*, dan *Cassia*. Menurut Fouillaud *et al*, (2018) AQ juga dapat ditemukan dalam jumlah yang lebih rendah pada jenis sayuran dan herbal lainnya. Sebagai contoh, sebuah penelitian telah memeriksa berbagai sayuran (selada, kubis, kacang-kacangan, dan kacang polong), jamu tertentu hingga minuman beraroma herbal untuk mengetahui kandungan senyawanya apakah mengandung emodin AQ "bebas" (aglikon), *chrysophanol*, dan *physcion* atau tidak. Dibuktikan bahwa, sayuran menunjukkan variabilitas *batch-to-batch* total AQ dari kadar 0,04 hingga 3,6 mg dan 5,9 hingga 36 miligram per kilogram.



Gambar 3. Turunan senyawa *anthraquinone* (AQ)

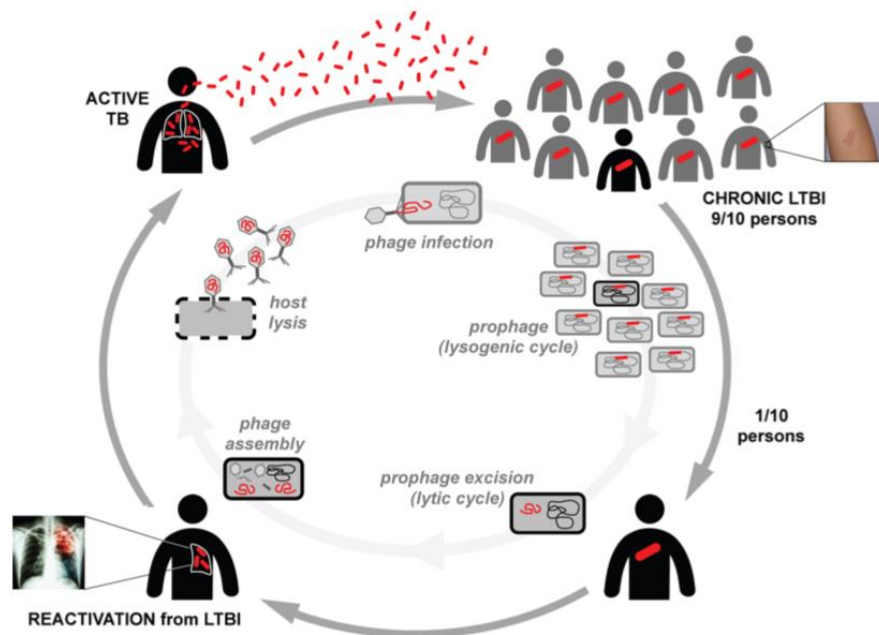
Secara manfaat AQ biasanya memberi warna pada tanaman dan telah digunakan secara luas sebagai pewarna alami makanan maupun senyawa antara dalam bidang kedokteran dan farmasi. Sudah sejak 2 dekade terakhir AQ digunakan sebagai obat pencahar dengan aktivitas antijamur dan antivirus. AQ yang tergolong dalam pencahar diantaranya; *physcion*, *chrysophanol*, *aloe-emodin*, *rhein*, dan *senoside* (Bone dan Mills, 2013). Sennosida adalah komponen aktif dari alat bantu konstipasi yang dijual bebas dan dibuat dari tanaman milik genus senna sedangkan turunan AQ jenis aloe-emodin cenderung dihasilkan dari tanaman yang mengandung aloevera seperti lidah buaya.

3.3. Tuberkulosis

Tuberkulosis (TB) adalah penyakit infeksius yang menyerang parenkim paru. TB dapat menyebar melalui getah bening atau pembuluh darah, misalnya ketika bersin dan ada percikan dahak (*droplet nuclei*) (Irianti, Kuswandi, dan Yasin, 2016). Penyakit ini termasuk salah satu penyakit menular paling berbahaya di dunia. Secara global diperkirakan 10 juta orang terjangkit TB pada tahun 2019. Pada paruh tahun 2020, terdapat 3 negara dengan prevalensi penyumbang pasien TB tertinggi yaitu India sebesar 26%, disusul Indonesia 8,5% yang sebelumnya menempati posisi ke 3 dan China sebesar 8,4%. Statistik peningkatan pasien dalam klasifikasi negara dari WHO berubah pada tahun 2021, dimana Indonesia menempati peringkat kedua dengan beban epidemi TB terbanyak didunia sebesar 14%. Menurut *World Health Organization* (WHO) pada *Global Tuberculosis Report* (2020) penyakit ini bisa menyerang siapapun dan dimanapun terutama pada laki-laki dewasa, tercatat di 30 negara dengan persentase hampir 90% setiap tahunnya. Tidak hanya itu orang yang memiliki imunitas rendah atau memiliki pola hidup yang kurang sehat seperti seorang mahasiswa dan memiliki penyakit penyerta seperti lansia, anak-anak, pasien diabetes, juga orang dengan HIV AIDS (ODHA) sangat beresiko terinfeksi TB. Berdasarkan jenis kelamin, persentase jumlah kasus pada laki-laki (umur ≥ 15 tahun) adalah 1,5 kali lebih tinggi dibandingkan perempuan yaitu 56% dan 32%.

Indonesia merupakan negara tropis. Sepanjang sejarah, wilayah tropis lebih mudah terjangkit penyakit infeksi menular dibandingkan dengan wilayah beriklim sedang. Faktor kelembaban udara serta variasi pertumbuhan biologis penunjang keanekaragaman hayati menghadirkan bakteri patogen yang sangat merugikan manusia seperti *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) sebagai penyebab utama TB (Skolnik dan Ambareen, 2010). Terkonfirmasi kurang lebih sebanyak 92.700 orang meninggal karena TB atau sekitar 11 orang meninggal perjamnya (Kemenkes, 2020). Sekitar 10% orang yang terinfeksi TB akan menjadi pasien TB aktif.

Mycobacterium tuberculosis (MTB) merupakan suatu bakteri yang pertama diisolasi oleh Robert Koch pada tahun 1882. Bentuk bakteri ini adalah basil tuberkel atau batang dan kurus dengan panjang sekitar 2 - 4 mm dan lebar 0,2 - 0,5 mm yang bergabung membentuk suatu rantai tanpa menghasilkan spora (kapsul). Dinding sel MTB terdiri dari peptidoglikan dan DAP (Diaminopimelik) dengan kandungan lipidnya kira-kira 60% yang berhubungan langsung pada arabinogalaktan (Indah, Parwati, dan Soeroto, 2007). Bakteri MTB memiliki sifat tidak tahan panas serta akan mati pada suhu 6°C selama 15 - 20 menit. Biakan bakteri ini dapat mati jika terkena sinar matahari langsung selama 2 jam. Dalam dahak, bakteri *mycobacterium* dapat bertahan selama 20 - 30 jam. Basil yang berada dalam percikan bahan dapat bertahan hidup selama 8 - 10 hari. MTB yang berada dalam suhu kamar dapat hidup 6 - 8 bulan dan dapat disimpan dalam suhu 20°C selama 2 tahun. MTB tahan terhadap berbagai bahan kimia dan disinfektan antara lain phenol 5%, asam sulfat 15%, asam sitrat 3% dan NaOH 4%. Basil ini dihancurkan oleh iodium tingtur dalam 5 menit sedangkan oleh alkohol 80% akan hancur dalam 2 - 10 menit.



Gambar 4. Siklus penularan MTB (Asensio, dkk 2017).

Manusia adalah satu-satunya reservoir MTB (bentuk bakteri basil merah). Siklus infeksi MTB dimulai dengan penularan basil melalui jalur pernapasan pasien TB aktif dengan cara mengaerosolisasi inang baru. Data epidemiologi menunjukkan bahwa 9 dari 10 individu yang terinfeksi dapat menjadi inang baru karena memiliki kondisi infeksi TB laten (LTBI) sebagai reservoir potensial untuk transmisi. Orang dengan LTBI yaitu pasien TB tanpa gejala dan tidak menular ini berisiko untuk mengaktifkan kembali TB di kemudian hari, dan 1 dari setiap 10 orang yang terinfeksi akan mengembangkan penyakit kronis ini dengan kembali menjadi TB aktif (Asensio, dkk 2017). Tingkat infeksi lain dari penyakit TB menitikberatkan kasus *Multi Drug Resistant Tuberculosis* (MDR-TB) yang terdeteksi akibat adanya resistensi pasien TB aktif terhadap 2 obat anti-tuberkulosis (OAT) paling kuat sekaligus yakni isoniazid dan rifampisin. Pada tahun 2018, Kementerian Kesehatan Republik Indonesia dan WHO memperkirakan terdapat sekitar 23.000 penderita MDR-TB di Indonesia. OAT tertera pada tabel 3.

Tabel 3. Pengelompokan OAT (Kemenkes, 2011)

Golongan dan Jenis Obat	Obat
Golongan-1 Obat lini pertama	<i>Isoniazid (H); Ethambutol (E); Pyrazinamide (Z); Rifampisin (R); Streptomycin (S)</i>
Golongan-2 Obat suntik/suntikan lini kedua	<i>Kanamycin (Km); Amikacin (AM); Capreomycin (Cm)</i>
Golongan-3 Golongan Floroquinon	<i>Ofloxacin (Ofx); Levofloxacin (Lfx); Moxifloxacin (Mfx)</i>
Golongan-4 Obat bakteriostatik lini kedua	<i>Ethionamide (Eto); Prothionamide (Pto); Cycloserine (Cs); Paraaminosalisilat (PAS); Terizidone (Trd)</i>

3.4. Pneumonia

Pneumonia berasal dari kata Yunani kuno “pneumon” yang berarti paru-paru. Secara medis, penyakit ini terjadi karena peradangan pada salah satu atau kedua parenkim paru yang bisa disebabkan oleh bakteri *Klebsiella pneumoniae* (Martin dan Bachman 2018). Menurut Tarina dan Kusuma (2017), Peradangan terjadi saat alveoli mengalami pembengkakan karena terisi cairan atau nanah sehingga timbul perbedaan ukuran antara lobus kiri dan lobus kanan menimbulkan gejala demam dan batuk-batuk (*bronchitis*), hingga sulit bernapas. Selain itu, ada penebalan dinding mukosa membuat batuk berdarah yang memperparah keadaan penderita. Pneumonia merupakan penyebab kematian no 6 di Indonesia, beberapa kategori orang yang paling beresiko terkena pneumonia diantaranya; perokok aktif, memiliki riwayat stroke, bayi berusia 0 – 2 tahun, lansia diatas 65 tahun, orang dengan riwayat asma, gagal jantung, diabetes, HIV/AIDS serta pengguna obat-obatan atau orang dengan masalah sistem imun. Menurut *World Health Organization* (2019), penularan pneumonia terjadi melalui darah, atau tetesan liur yang terbawa udara (*droplets*) dari batuk atau bersin. Pencegahan penularan penyakit dilakukan dengan cara menjaga sanitasi dan pola hidup disamping mengkonsumsi antibiotik.

Klebsiella pneumoniae merupakan bakteri patogen gram negatif dari famili *Enterobacteriaceae* berbentuk batang pendek memiliki ukuran 0,5 – 0,6 μ dan bersifat fakultatif anaerob. Pada media agar, *Klebsiella pneumoniae* menunjukkan pertumbuhan fenotip *mucoïd* atas aktifitas fermentasi laktosa dengan kapsul polisakarida yang besar juga tidak motil karena tidak memiliki flagel. Bakteri tersebut menghasilkan enzim betalaktamase yang dapat menghidrolisis cincin beta-laktam dari antibiotik yang digunakan, seperti; meropenem, *chloramphenicol*, *cyprofloxacin* dan *ampicillin*. 98,4% bakteri sensitif terhadap meropenem, 92,5% terhadap kloramfenikol, 80% terhadap siprofloksasin dan 2% terhadap ampisilin (Tarina dan Kusuma, 2017). Tingginya sensitifitas dari meropenem yaitu antibiotik *carbapenem* yang dapat menghambat perkembangan dinding sel bakteri membuat *Enterobacteriaceae* ini resisten. Diungkapkan oleh Sheu *et al* (2019), uji klinis yang dilakukan oleh Daikos

dan Markogiannakis (2011), dosis tinggi *carbapenem* harus diturunkan menjadi MIC 4 mg/L dengan kombinasi antibiotik lain guna menghindari resistensi.

Menurut Hupp dkk (2018) *Streptococcus pyogenes* adalah bakteri yang juga termasuk kedalam penyebab pneumonia dari streptococcal grup A dengan prevalensi sebesar 2-5%. pasien *Streptococcus pyogenes* pneumonia terjangkit pada usia 31 - 86 tahun dengan komorbid; hipertensi, diabetes militus, dan jantung koroner. Bakteri grup ini memiliki ciri katalase dan oksidase negatif yang tumbuh pada suhu 37°C (Gera dan Melver, 2013). *S. pyogenes* termasuk kedalam kelompok bakteri gram positif, berbentuk kokus yang terangkai seperti rantai dan memiliki berbagai protein eksotoksin pada dinding sel. Penanganan penyakit dan penggunaan antibiotik beta-laktam kembali digunakan untuk mengatasi *Streptococcus pyogenes* pneumonia namun dengan kombinasi klindamisin dan levofloksasin (Tamayo *et al*, 2016). Pada studi yang dilakukan oleh Oppegaard *et al* (2020) variabel resistensi tertinggi ada pada kombinasi *erythromycin* dengan *clindamycin*. Dua dekade sebelumnya, Arvand *et al* (2000) telah mengkalkulasi resistensi antimikroba dari eritromisin sebesar 12,7%, 55% terhadap klindamisin serta 2,8% dari siprofloksasin.

3.5. Infeksi Aliran Darah

Infeksi aliran darah adalah salah satu masalah kesehatan global dan sangat invasif, progresif serta mengancam jiwa. Istilah lain dari infeksi ini disebut bakteremia, yaitu adanya pertumbuhan bakteri atau jamur pada saluran darah, bisa menimbulkan demam, turunnya tekanan darah hingga komplikasi organ dan jaringan tubuh yang dapat menyebabkan kematian. Menurut Sianipar *et al*, (2017) *Escherichia coli* merupakan bakteri terbanyak yang diisolasi dari kultur darah pasien atas infeksi mematikan ini namun termasuk suatu bakteri dengan tingkat resistensi tinggi terhadap berbagai antibiotik diantaranya; *ampicillin*, *ceftazidime*, *ceftriaxone*, *cefepime*, *aztreonam*, *ciprofloxacin*, dan *trimetoprim*. *Escherichia coli* adalah bakteri gram negatif termasuk dalam klasifikasi *Enterobacteriaceae* dengan ukuran lebar 1,1 – 1,5 µm dan panjang 2 – 6 µm berbentuk batang dan memiliki flagel sehingga bersifat motil.

E. coli sulit diatasi karena kemampuannya dalam memproduksi *extended spectrum beta lactamases* (ESBLs) yang dapat menghidrolisis antibiotik golongan beta laktam golongan ketiga, keempat dan monobaktam (Prasetya *et al*, 2019). Termasuk kedalam bakteri umum dan aman hidup dalam tubuh manusia, regulasi gen yang memungkinkan bakteri ini untuk mempertahankan diri dan membuat sepsis dalam sel inangnya dipengaruhi oleh faktor adhesin, toksin, faktor akuisisi besi, lipopolisakarida, kapsul polisakarida dan invasi sesamanya (Sarowska, *et al*. 2019).

Mengacu pada Firdausya, dkk (2019) Bakteri yang juga sering menginfeksi aliran darah adalah *Staphylococcus aureus*, bakteri ini resisten terhadap *ampicillin*. Dari Ghanamani, dkk (2016) resistensi juga terjadi pada antibiotik *quinolone*, *vanomycin*, sulfonamida, *tetracyclin*, *trimethophrim*, *chloramphenicol* serta *clindamicyn*. Pada pemeriksaan mikroskopik dengan pewarnaan gram, *Staphylococci* tampak sebagai bakteri gram positif berbentuk kokus dan irregular (tak menentu) namun bergerombol dengan ukuran 0,5 – 1,5 μm , memiliki katalase positif dengan adanya gelembung gas O_2 dan oksidase negatif (Jayanti, dkk 2020). Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* terjadi pada pH optimal 7,4 dan kelangsungan hidupnya berkurang pada suhu $-10 - 0^\circ\text{C}$. Sebagai bakteri yang bersifat fakultatif aerob dan anaerob, bakteri ini akan membentuk koloni besar berwarna kuning ataupun putih hasil produksi karotenoid pada medium agar (Ghanamani dkk, 2016). Pada visual TEM *S. aureus* menunjukkan dinding sel yang tebal dengan membran sitoplasma amorf, berbeda dari bakteri lainnya. Faktor virulensi meliputi adhesin, perusakan imunitas dari sel inang atas keberadaan alpha-toksin juga protein A, invasi dengan enzyme ekstraseluler serta induksi toksin.

3.6. Ekstraksi

Proses pemisahan bahan atau senyawa dari suatu campuran menggunakan pelarut tertentu disebut dengan ekstraksi (Mukhriani, 2014). Prinsip ekstraksi pada bahan alam yaitu pembukaan jaringan atau dinding sel dengan perlakuan dingin atau panas sebagai proses penarikan senyawa target menggunakan pelarut organik yang

sesuai berdasarkan sifat polaritas dari senyawa yang akan diambil. Ekstraksi pelarut terbagi atas dua macam yaitu ekstraksi padatan-cairan (*solid-liquid extraction*) dan ekstraksi cairan-cairan (*liquid-liquid extraction*). Ekstraksi padatan-cairan berarti pengambilan atau pemisahan senyawa metabolit sekunder dari suatu matriks bahan padat dengan pelarut tertentu, sedangkan ekstraksi cairan-cairan (*liquid-liquid extraction*) adalah pengambilan atau pemisahan senyawa metabolit sekunder yang telah terlarut sebelumnya pada suatu bahan pelarut dengan cara mencampurkannya dengan pelarut lain yang bersifat *immiscible* (tidak dapat bercampur baik) dengan pelarut awal tetapi memiliki kemiripan tingkat polaritas dengan senyawa yang akan dipisahkan, sehingga senyawa-senyawa target dapat terlarutkan atau terkumpul pada pelarut baru tersebut (Nugroho, 2017). Terdapat beberapa metode ekstraksi antara lain: maserasi, perkolasi, ekstraksi dengan refluks, ekstraksi dengan Soxhlet, ekstraksi dengan ultrasonikasi, ekstraksi dengan tekanan serta ekstraksi dengan microwave (Agoes, 2007).

Pemilihan metode ekstraksi didasarkan pada karakteristik bahan dan senyawa metabolit sekunder yang akan diekstrak, rendemen ekstrak yang akan diperoleh, kecepatan ekstraksi serta biaya ekstraksi. Menurut Sindora dkk, (2017) metode ekstraksi yang bisa digunakan dalam memisahkan AQ secara efektif adalah ekstraksi dengan maserasi. Pada metode ini bahan yang akan diekstrak direndam dengan pelarut dalam sebuah erlenmeyer untuk kemudian ditempatkan diatas alat shaker (alat penggojok/pengadukan skala besar). Sistem yang digunakan yaitu sistem pelarut diskontinyu atau pelarut diam tanpa ada pengurangan ataupun penambahan selama proses berlangsung. Instrumen ini dilengkapi dengan LCD untuk display pengaturan rotasi permenit (RPM), keadaan suhu yang diinginkan ($^{\circ}\text{C}$) serta penentu waktu tertentu untuk lamanya proses maserasi. Selain itu, pada orbital shaker yang terinkubasi mempunyai hubungan yang linier dengan transfer rasio oksigen (OTR) dari udara ke cairan yang diagitasi didalamnya sehingga proses pemisahan senyawa juga bisa berlangsung optimal tanpa kontaminasi (Bates dkk, 2016).



Gambar 5. *Incubated orbital shaker*

Prinsip dari ekstraksi maserasi dingin adalah penyarian zat aktif yang dilakukan dengan cara merendam serbuk sampel dalam cairan penyari yang sesuai selama sehari atau beberapa hari pada temperatur rendah terlindungi dari cahaya dan bebas udara, cairan penyari akan masuk ke dalam sel melewati dinding sel. Isi sel akan larut karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan di dalam sel dengan di luar sel. Larutan yang konsentrasinya tinggi akan terdesak keluar dan diganti oleh cairan penyari dengan konsentrasi rendah (proses difusi). Peristiwa tersebut dapat dipercepat dengan adanya agitasi atau rotasi permenit (rpm) dari shaker sampai terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar sel dan di dalam sel. Selama proses maserasi dilakukan penggantian cairan penyari setiap hari. Endapan yang diperoleh dipisahkan dan filtratnya dipekatkan. Keuntungan dari metode ini ialah peralatannya yang sederhana, dengan waktu yang relatif lebih lama. Pengerjaan metode maserasi dengan waktu tertentu memungkinkan banyak senyawa yang akan terekstraksi (Susanty dan Bachmid, 2016).

3.7. Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Selada Hijau (*Lactuca sativa* L.)

Glikosida merupakan senyawa alam yang memberikan pengaruh fisiologis terbentuk dari gugus non gula (aglikon) dan gula (glikon). Terdapat variasi gugus aglikon yang beragam, salah satunya golongan glikosida AQ. Identifikasi senyawa *Anthraquinone* (AQ) dilakukan dengan metode Borntrager dan Borntrager yang di

modifikasi dimana senyawa AQ akan menunjukkan karakteristik warna merah, violet, kuning, hijau atau ungu dengan basa jika positif ada dalam sampel. Jika konsentrasi AQ sangat stabil atau terdapat jenis antranol maka kedua metode negatif dan larutan akan berwarna putih (Evans dan Evans, 2009).

3.8. Metode DPPH

Menurut Antolovich, Prenzler dan Patsalides (2002), salah satu metode penentuan aktifitas antioksidan yaitu uji DPPH atau *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*. DPPH merupakan radikal bebas yang stabil dan tidak membentuk dimer (identik) akibat delokalisasi dari elektron bebas pada seluruh molekul (Molyneux, 2004). Delokalisasi tersebut menyebabkan larutan berwarna ungu sehingga dapat diukur absorbansinya pada panjang gelombang 520 nm menggunakan spektrofotometer UV-VIS. Uji antioksidan metode ini terjadi saat larutan DPPH direaksikan dengan senyawa pendonor proton atau atom hidrogen, karena hal tersebut warna ungu larutan akan hilang seiring tereduksinya DPPH. Hasil uji dilaporkan sebagai IC₅₀ atau jumlah antioksidan yang diperlukan untuk menurunkan 50% konsentrasi awal DPPH.

% inhibisi adalah perbandingan antara selisih absobansi blangko dengan absorbansi sampel ditambah blangko yang digunakan sebagai penentu persentase hambatan suatu bahan tertentu terhadap radikal bebas. Keuntungan dari metode ini yaitu sederhana dan waktu analisis cepat.

3.9. Isolasi Bahan Alam

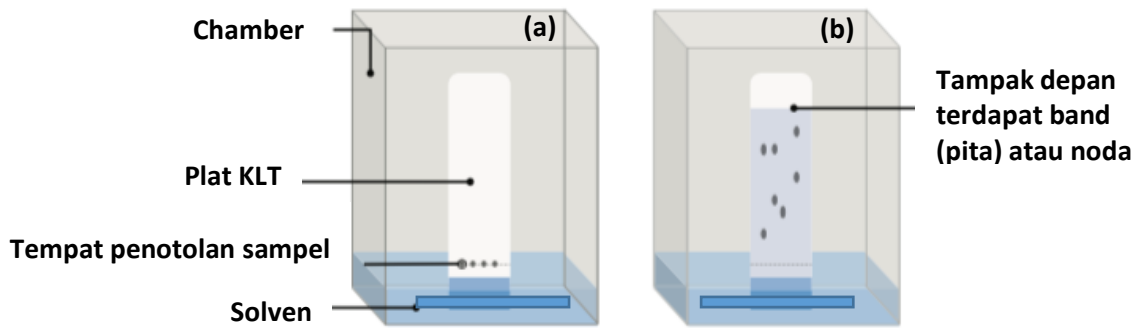
Pemurnian senyawa bioaktif dapat dilakukan dengan teknik kromatografi kolom. Banyak molekul bioaktif yang telah diisolasi dan dimurnikan juga menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Bahan-bahan tumbuhan mengandung sejumlah besar fitokimia kompleks yang sulit dipisahkan sehingga perlu adanya peningkatan polaritas menggunakan beberapa fase ekstraseluler dalam mempermudah pemisahan. KLT selalu digunakan untuk menganalisis fraksi senyawa dengan kromatografi kolom (Julianto, 2019).

3.9.1 Kromatografi

Kromatografi adalah suatu teknik pemisahan campuran berdasarkan perbedaan distribusi dari komponen-komponen dalam fasa gerak dan fasa diam. Fasa gerak adalah suatu gas atau cairan, sedangkan fasa diam dapat berupa cairan atau padatan (Rizalina, Cahyono, dan Mursiti, 2018). Dalam makna yang lain, fase diam dapat berupa pembentukan kolom dimana fase gerak dibiarkan untuk mengalir (kromatografi kolom) atau berupa pembentukan lapis tipis dimana fase gerak dibiarkan untuk naik berdasarkan kapilaritas (kromatografi lapis tipis) (Skoog, Holler, dan Crouch, 2007). Fase stasioner yang biasa digunakan adalah silika, alumina, selulosa dan poliamida sedangkan untuk fase geraknya disesuaikan dengan kepolaran senyawa yang akan di isolasi untuk masing-masing metode kromatografi.

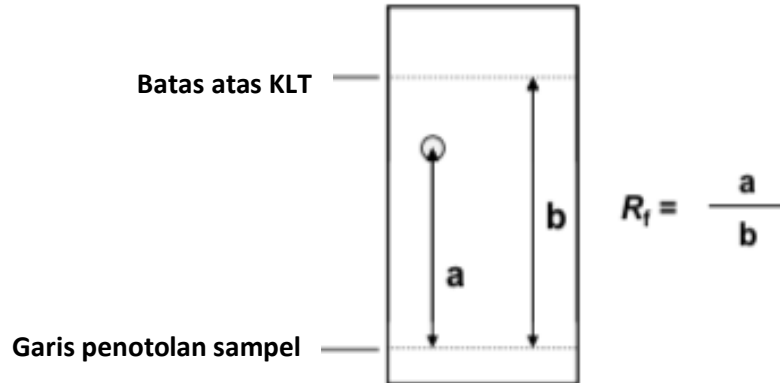
3.9.1.1 Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLT)

Kromatografi lapis tipis preparatif (KLT) adalah salah satu bentuk metode pemisahan senyawa dimana fase diam adalah suatu lapisan tipis datar atau plat dengan bahan penyangga kaca yang terlapis penjerap serbuk halus. Fase diam yang paling banyak digunakan adalah silika, dalam hal ini digunakan gel Si-PF₂₄₅ ukuran 20 x 20 cm. Kelompok silanol (Si-O) maupun siloksan (Si-O-Si) dapat memisahkan senyawa berdasarkan ikatan hidrogen, interaksi dipol-dipol, dan interaksi *disperse*. Pemisahan dengan KLT akan memurnikan senyawa dengan hasil berupa noda berbentuk pita yang kemudian diambil dengan cara dikerik dan hasilnya dilarutkan menggunakan pelarut tertentu. Contoh adsorben atau fase diam lainnya yaitu alumina (asam, netral, dan basa), magnesium oksida, magnesium silikat (Florisil), selulosa (polimer unit D-glukopiranososa), dan poliamida (polimer dari $[NH(CH_2)_6NHCO(CH_2)_x C]_n$) (Cazes, 1997). Untuk fase gerak KLT tersusun atas 2 sampai 3 solven seperti heksana, asam asetat, diklorometana, toluen, dioksana juga kloroform (Lundanes dkk, 2014). Jenis kromatografi ini adalah yang paling murah karena tidak melibatkan banyak instrumentasi dan dapat memurnikan senyawa hasil kromatografi kolom dalam satu kali proses atau satu waktu yang sama (mengisolasi senyawa tunggal pada fraksi aktif).



Gambar 6. (a) KLT sebelum elusi (b) KLT setelah elusi

Dalam KLT, proses elusi atau ukuran kecepatan migrasi suatu senyawa ditentukan didalam *chamber* yang akan berisi eluen. Setelah itu, senyawa yang terpisah bisa dideteksi menggunakan lampu UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm.



Gambar 7. Faktor reterdasi pada KLT (Lundanes dkk, 2014).

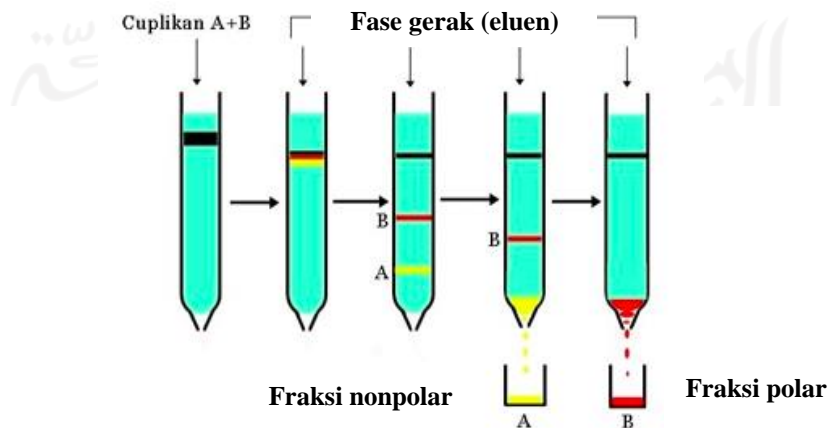
3.9.1.2 Kromatografi Kolom

Pada dasarnya, kromatografi kolom adalah pemisahan komponen - komponen dalam sampel dengan cara mengalirkan sampel melewati suatu kolom. Sampel dalam hal ini dibawa oleh *carrier* atau fase gerak non polar (*mobile phase*), sedangkan kolom berisi suatu bahan beserta fase diam (*stationary phase*) yang bersifat polar dan berfungsi memisahkan komponen-komponen sampel. Prinsip pemisahan kromatografi adsorpsi adalah kompetisi antara zat terlarut (sampel) dan fase gerak dengan permukaan fase diam. Kekuatan adsorpsi bergantung pada sifat gugus fungsionalnya, dimana gugus-gugus fungsional ini menentukan tingkat kepolaran. Proses adsorpsi dipengaruhi oleh kekuatan ikatan antara solut dan adsorben dan kekuatan untuk memisahkan solut dari adsorben (Wati, 2014). Dalam arti lain, senyawa yang

berinteraksi lemah dengan fase diam akan bergerak lebih cepat melalui sistem kromatografi. Sebaliknya, senyawa dengan interaksi yang kuat dengan fase diam akan bergerak sangat lambat (Christian, 1994; Skoog, 2007). Semakin kecil waktu retensi yang dihasilkan, semakin non-polar senyawa yang terelusi. Hal ini ditunjukkan pada **Gambar 8**. Proses elusi pada Kromatografi kolom.

Kromatografi kolom preparatif klasik berbentuk tabung gelas dengan diameter 5 mm hingga 50 mm dan panjang 5 cm hingga 1 m dilengkapi keran dengan tutup kaca atau serat kaca untuk mencegah hilangnya fase diam. Dua cara yang sering digunakan untuk persiapan kolom adalah metode basah dan metode kering (Ubay, 2020).

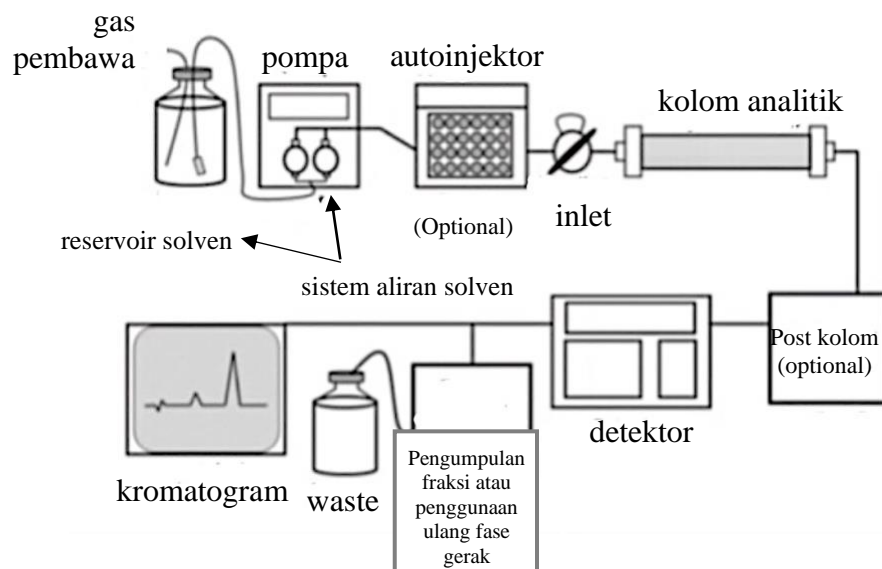
1. Metode Basah, fase diam dibasahi dengan fase gerak sampai berubah menjadi bubuk di luar kolom dan kemudian perlahan-lahan dituangkan ke dalam kolom. Mencampur dan menuangkan harus sangat berhati-hati untuk menghindari gelembung udara. Solusi organik ditambahkan ke bagian atas fase diam dengan pipet. Lapisan ini umumnya ditutupi dengan lapisan kecil pasir atau kapas, atau dapat dengan wol kaca untuk melindungi bentuk lapisan organik dari tumpahan eluen. Selain itu, eluen perlahan mengalir melalui kolom sambil mengelusi sampel bahan organik.
2. Dalam metode kering, kolom pertama diisi dengan bubuk fase kering diam dan kemudian diisi dengan fase gerak sampai semua kolom basah. Pada titik ini, fase diam tidak boleh kering sehingga fase gerak harus terus-menerus mengalir.



Gambar 8. Proses elusi kromatografi kolom

3.9.1.3 Kromatografi Cair Kerja Tinggi (KCKT)

Kromatografi cair kinerja tinggi, yang sebelumnya disebut kromatografi cair tekanan tinggi, dikembangkan dari kromatografi cair kolom klasik. KCKT modern menggunakan tekanan tinggi untuk memaksa fase gerak dan analit melalui kolom tertutup yang dikemas dalam partikel berukuran mikron sebagai fase diam (LaCourse dan William, 2017). KCKT terdiri atas dua jenis yaitu KCKT fase normal (*Normal-phase*) dan KCKT fase terbalik (*Reverse-phase*). Prinsip kerja dari dua jenis KCKT adalah pemisahan komponen analit berdasarkan polaritas, setiap campuran yang keluar akan terdeteksi dengan detektor dan direkam dalam bentuk kromatogram. Kuantifikasi KCKT ditentukan dari jumlah peak yang menyatakan jumlah komponen, sedangkan luas peak menyatakan konsentrasi komponen dalam campuran (Hendayana, 2006). Instrumentasi KCKT ditunjukkan pada skema alat **Gambar 9**.



Gambar 9. Instrumen KCKT (LaCourse dan William, 2017).

1. Reservoir solven dan sistem aliran solven

Reservoir fase gerak atau solven dapat berupa senyawa apapun yang inert atau tidak ikut bereaksi. Biasanya berisi 0,5 - 2 L pelarut, dan harus memiliki tutup yang juga berfungsi untuk mencegah debu, mengurangi penguapan pelarut dan

memungkinkan tekanan tertentu dalam botol (LaCourse dan William, 2017). Tujuan dari pompa (sistem aliran solven) adalah untuk memberikan aliran fase gerak yang tepat, akurat, dapat direproduksi, konstan, dan *pulse-free* untuk masuk ke dalam kolom. Tekanan yang diberikan dari pompa bisa berkisar antara 6000 – 9000 psi.

Tiga pompa utama KCKT yang sering digunakan: pompa tekanan konstan, pompa berbasis jarum suntik (*syringe-based*) atau pompa perpindahan, dan pompa aliran konstan. Baik pompa bertekanan konstan dan berbasis jarum suntik tidak mudah disesuaikan dengan pengiriman pelarut gradien; oleh karena itu, pompa aliran konstan adalah yang paling umum. Mayoritas pompa aliran tinggi komersial yang tersedia saat ini dirancang dengan pompa piston bolak-balik sederhana. Piston didorong masuk dan keluar dari ruang pelarut di kepala pompa, yang biasanya memiliki volume 10 – 100 μL . Segel piston menjaga fase gerak agar tidak bocor dari pompa. Pada proses inlet, piston ditarik dari bagian atas pompa, menciptakan zona tekanan rendah. Tekanan rendah menyebabkan inlet masuk (yaitu, dari reservoir fase gerak) terbuka dan outlet keluar (yaitu, pengiriman ke kolom) dibagian ujung pompa (Snyder dkk, 1988).

Pemisahan dapat dilakukan secara isokratik, yang berarti bahwa pelarut yang dialirkan ke kolom tidak berubah komposisi selama pemisahan. Untuk pemisahan yang lebih kompleks, diperlukan elusi gradien. Secara umum, elusi gradien dilakukan dengan mengubah proporsi eluen selama pemisahan. Dengan demikian, senyawa elusi awal tetap terlarut dengan baik, sedangkan senyawa yang lebih tertahan terelusi lebih cepat. Sistem lain dengan *autosampler* yaitu binary (dua pelarut, dua pompa) dan quaternary (4 pelarut dengan 1 pompa) (Shoyket, Broeckhoven, dan Dong, 2019).

2. Kolom KCKT

Kolom merupakan tempat pemisahan senyawa terjadi. Kolom KCKT biasanya terbuat dari baja tahan karat, kecuali kolom kapiler dan nanoflow yang biasanya terbuat dari tabung silika leburan. Beberapa kolom baja memiliki dinding bagian dalam kaca agar lebih inert (Lundanes dkk, 2014). Fase diam berdiameter 3 - 4 μm ini memiliki laju alir 1 – 2 mL/menit sehingga inlet sampel dalam 1 kali analisis menyesuaikan, yaitu sekitar $< 20 \mu\text{g}$ (Suprianto, 2018).

Kolom yang digunakan pada KCKT fase normal yaitu fase diam berupa senyawa polar biasanya seperti silika, amino atau siano. Sebaliknya, pada KCKT fase terbalik, pemisahan senyawa terjadi dengan fase diam bersifat non-polar, contoh fase diam untuk KCKT fase terbalik berasal dari hidrokarbon alkil diantaranya rantai C-8 atau C18 yang terikat dengan basis silika dan kolom C18 atau oktadesil silika (ODS) (Elsa, 2017). Kolom ODS merupakan kolom yang banyak digunakan pada metode KCKT. Kolom dengan Panjang 150 mm ini memiliki diameter dalam 4,6 mm dengan ukuran partikel 3,5 - 10 μm . ODS C-18 juga terbukti andal dalam pemisahan senyawa bukan hanya non-polar tetapi juga senyawa cukup polar atau semi polar bahkan senyawa lipofilik dengan efisiensi dan kemampuan *reproducibility* yang tinggi (Thermo, 2011).

3. Detektor

Karakteristik ideal detektor KCKT adalah sensitivitas tinggi, stabilitas baik, linieritas, waktu respons singkat, keandalan, non-destruktifitas, kemudahan penggunaan, dan volume mati rendah. Detektor KCKT dapat digunakan sejalan dan bersamaan, memungkinkan penggunaan berbagai teknik deteksi dalam analisis tunggal menggunakan variasi instrumen yang berbeda. Output yang dihasilkan dalam analisis berupa grafik yang disebut sebagai kromatogram. Tabel 4. mencantumkan beberapa detektor KCKT yang umum digunakan dalam analisis pemisahan senyawa.

Tabel 4. Karakteristik detektor KCKT (Angelika, Schuster, dan Rainer, 2001).

Parameter	Detektor					
	UV-VIS	Fluore-scence	Elektro-kimia	Konduk-tometri	Refraktif index	Spektro-metri massa
Klasifikasi	<i>Solute</i>	<i>Solute</i>	<i>Solute</i>	<i>Bulk</i>	<i>Bulk</i>	<i>Bulk</i>
Respons	Selektif	Selektif	Selektif	Selektif	Selektif	Selektif
Sensitivitas	2×10^{-10}	1×10^{-12}	1×10^{-12}	2×10^{-10}	1×10^{-6}	1×10^{-12}

Kesuaian gradien	Sesuai	Sesuai	Terbatas	Sesuai	Tidak sesuai	Sesuai
Sensitivitas aliran	Rendah	Rendah	Tinggi	Tinggi	Tinggi	Tinggi
Sensitivitas suhu	Rendah	Rendah	Tinggi	Tinggi	Tinggi	Tinggi

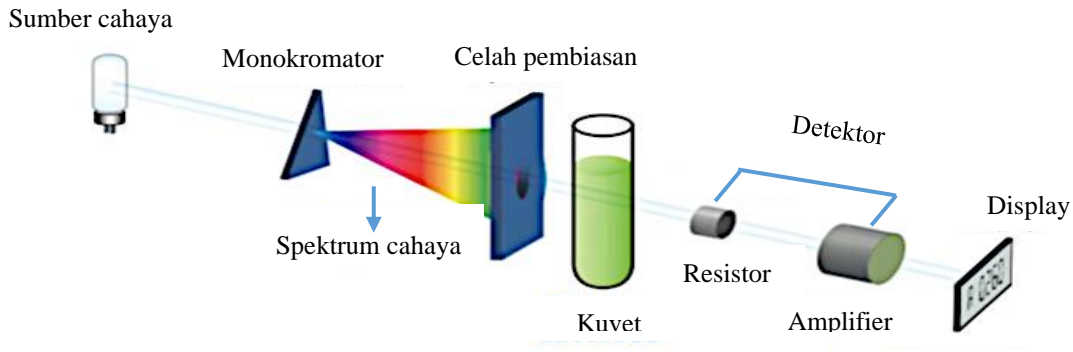
Prediksi konsentrasi senyawa suatu analit dalam sampel ditentukan berdasarkan kurva kalibrasi yaitu kurva yang menunjukkan hubungan antara respon instrumen terhadap konsentrasi analit pada beberapa seri konsentrasi dimana nantinya akan diperoleh persamaan regresi linier $y = bx + a$, y merupakan respon instrumen, x adalah konsentrasi, a menunjukkan intersep y yang sebenarnya sedangkan b berarti slope sebenarnya. Koefisien korelasi (r) juga diperoleh guna menggambarkan linieritas suatu metode dengan kriteria $r \geq 0,999$ (Harvey, 2000).

3.10 Spektrofotometer UV-VIS

Spektrofotometer merupakan alat yang digunakan untuk mengukur energi secara relatif saat energi tersebut ditransmisikan, direfleksikan, dan diemisikan sebagai fungsi dari suatu spektrum dengan panjang gelombang tertentu disertai alat pengukur intensitas cahaya yang ditransmisikan (absorpsi) (Khopkar, 2008). Spektrofotometer UV-Vis adalah teknik analisis spektrometer yang menggunakan sumber radiasi elektromagnetik ultra violet dekat (190 nm – 380 nm) dan sinar tampak (380 nm – 780 nm) (Behera, Ghanti, dan Ahmad, 2012).

Syarat sampel dapat dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-VIS diantaranya yaitu bersifat larutan, berwarna, memiliki gugus kromofor dan auksokrom, serta memiliki ikatan rangkap terkonjugasi. Untuk senyawa logam, harus dalam bentuk ion (Riyanto, 2014). Menurut *GE Healthcare Life Science* dalam *Spectrophotometry*

Handbook (2012), instrumen spektrofotometer UV-VIS memiliki 4 komponen utama yang terdiri dari sinar, monokromator, kuvet, dan detektor.



Gambar 10. Skema Spektrofotometer UV-VIS

1. Sumber cahaya berfungsi memberikan energi radiasi pada daerah panjang gelombang yang tepat dan mempertahankan intensitas sinar yang tetap untuk pengukuran. Sumber radiasi untuk spektrofotometer UV-VIS adalah lampu hidrogen atau deuterium dan lampu filamen. Lampu hidrogen digunakan untuk mendapatkan radiasi di daerah ultraviolet sampai 350 nm. Lampu filamen digunakan untuk daerah sinar tampak sampai inframerah dekat dengan panjang gelombang 350 nm sampai sekitar 250 nm.
2. Monokromator berfungsi menghasilkan radiasi monokromatis yang diperoleh dilewatkan melalui kuvet berisi sampel dan blanko secara bersamaan dengan bantuan cermin berputar
3. Kuvet adalah tempat bahan yang akan diukur serapannya. Kuvet harus dibuat dari bahan yang tidak menyerap radiasi pada daerah yang digunakan, umumnya terbuat dari kaca tembus sinar tetapi bisa pula terbuat dari plastik.
4. Detektor adalah material yang dapat menyerap energi dari foton dan mengubahnya dalam bentuk lain, yaitu energi listrik.

5. *Display* atau tampilan mengubah sinar listrik dari detektor menjadi pembacaan yang berupa meter atau angka tertentu sesuai dengan hasil analisis (Warono dan Syamsudin, 2013).

Menurut Fatimah dan Syamsul (2008), pengukuran spektrofotometer ini mengikuti landasan hukum Lambert dan Beer yakni bila suatu cahaya monokromatis dilewatkan melalui suatu media transparan, maka intensitas cahaya yang di transmisikan sebanding dengan konsentrasi larutan sampel dan ketebalan sel yang digunakan berdasarkan persamaan:

$$A = \log I/I_0 \text{ atau } A = a.b.c \dots\dots\dots(1)$$

Dimana:

A = absorbansi

a = koefisien serapan molar

b = tebal media cuplikan yang dilewati sinar

c = konsentrasi unsur dalam larutan cuplikan (g/L)

I_0 = Intensitas sinar mula-mula

I = Intensitas sinar yang diteruskan

$$Y = ax - b \dots\dots\dots(2)$$

Dimana; Y = absorbansi

a = konstanta

x = konsentrasi

b = kemiringan/slope

Penentuan kadar menggunakan Spektrofotometer UV-Visible bisa dilakukan menggunakan metode kalibrasi. Standar induk maupun pengenceran dianalisis pada panjang gelombang maksimum. Bila sistem ideal akan diperoleh garis lurus titik (0,0) menyatakan hubungan absorbansi dengan konsentrasi (Yanlisastuti dan Fatimah, 2016). Selanjutnya pengukuran absorbansi analit ditentukan, aplikasi perhitungan dilakukan secara kuantitatif juga komparatif dengan perbandingan langsung pada persamaan kurva guna menentukan kadar senyawa. Keunggulan dari metode ini adalah

proses penentuan kadar berlangsung efisien dan cepat. Adapun syarat utama metode kalibrasi yaitu analit harus larut sempurna dan berwarna atau dapat dibuat berwarna (Kristianingrum, 2016).

3.11. *Fourier Transform Infra-Red (FTIR)*

Spektroskopi *Fourier Transform Infra-Red* (FTIR) atau dalam bahasa Indonesia disebut spektroskopi inframerah transformasi Fourier adalah suatu instrumen elusidasi struktur senyawa organik di wilayah inframerah yang didasarkan atas interaksi molekul dengan radiasi elektromagnetik pada daerah bilangan gelombang 500 – 4000 cm^{-1} (Dachriyanus, 2004). Karakterisasi sampel bisa dianalisis dalam bentuk larutan, cairan, padatan serbuk, film, serat, hingga gas. Prinsip dasar analisis FTIR yaitu apabila senyawa organik dilewatkan sinar inframerah maka molekulnya dapat menyerap (absorpsi) energi sehingga terjadi transisi tingkat vibrasi (*ground state*) dan tingkat vibrasi tereksitasi (*excited state*), jumlah frekuensi tertentu yang melewati cuplikan (tanpa diserap) diukur sebagai persentase transmitansi (Kristianingrum, 2016). Perubahan energi dinyatakan dengan tetapan Planck:

$$\Delta E = h \cdot \nu \text{ dengan,}$$

$$\nu = \frac{c}{\lambda}$$

dimana h adalah tetapan Planck $6,6242 \times 10^{-27}$ erg det dan ν merupakan frekuensi dalam Hertz (Hz) yang menunjukkan hubungan frekuensi dengan panjang gelombang (λ). Energi total sebanding dengan frekuensi vibrasi dan tetapan gaya (k) dari pegas atas massa dua atom yang saling terikat (m_1 dan m_2), sehingga berlaku Hukum Hooke (Stuart, 2004) dalam menentukan daerah vibrasi:

$$\nu = \frac{1}{2\pi c} \left(\frac{k}{(m_1 \cdot m_2)/(m_1 + m_2)} \right)^{1/2}$$

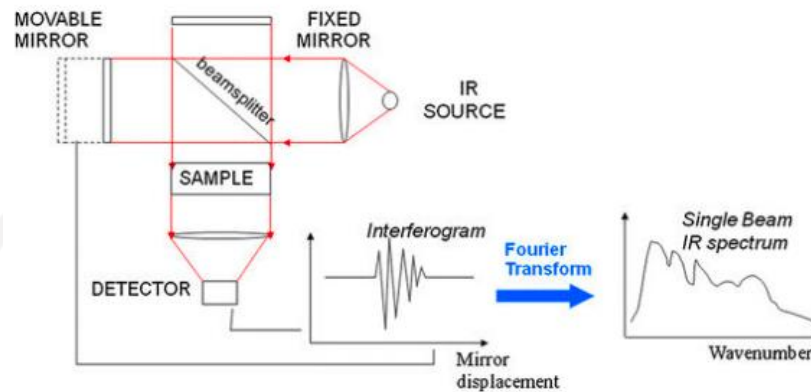
Keterangan,

$$\begin{aligned} V &= \text{Jumlah gelombang (cm}^{-1}\text{)} \\ \pi &= 22/7 \\ K &= \text{Tetapan pegas/ gaya (dyne cm}^{-1}\text{)} \\ C &= \text{Kecepatan cahaya } 3 \times 10^{10} \text{ (cm dt}^{-1}\text{)} \\ \left(\frac{m_1 \cdot m_2}{m_1 + m_2}\right) &= \mu \end{aligned}$$

Dua (2) Jenis vibrasi dari suatu ikatan molekul poliatomik:

1. Peregangan ikatan (*stretching*), terjadi saat dua atom berikatan disebabkan karena kedua inti terikat pada pasangan elektron yang sama. Vibrasi *stretching* bervariasi, di antaranya seperti *scissoring* (pada bidang), *rocking* (pada bidang), *wagging* (diluar bidang) serta *twisting* (diluar bidang).
2. Pengerutan ikatan (*bending*), vibrasi yang terjadi karena naik turunnya ikatan.

Instrumen spektroskopi yang didasarkan atas operasi inferometer disebut spektrofotometer sistem optik *Fourier Transform Infra Red* (FTIR). Proses berlangsungnya analisis FTIR sebagai berikut; sinar dari sumber sinar infra red diteruskan, kemudian dipecah oleh *beamsplitter* menjadi dua bagian sinar yang saling tegak lurus. Sinar tersebut akan dipantulkan oleh dua (2) cermin yaitu cermin tegak lurus yang dapat bergerak (M) dan cermin tetap (F) untuk akhirnya kembali ke *beamsplitter* sehingga saling berinteraksi, sebagian sinar akan diarahkan menuju cuplikan sampel. Gerakan cermin akan membuat sinar yang terbaca pada detektor menjadi fluktuatif, kedua cermin berfungsi menentukan perbedaan jarak radiasi inframerah disebut retardasi. Jika jarak cermin terhadap detektor sama maka kedua sinar saling menguatkan, sebaliknya jika jarak cermin terhadap detektor berbeda maka kedua sinar saling melemahkan. Hubungan antara intensitas radiasi IR yang diterima detektor dari sampel terhadap retardasi menghasilkan interferogram dan diubah menjadi spektra IR menggunakan operasi matematika.



Gambar 11. Skema Spektroskopi FTIR (Mezzetti dan Leibel, 2017)

Untuk memperoleh informasi struktur senyawa organik, terdapat daerah serapan senyawa atas radiasi infra merah yang terjadi.

Tabel 5. Daerah serapan Inframerah
Bilangan gelombang dalam cm^{-1}

4000	2500	2000	1800	1650	1550	650
O-H	C-H	C=C	Serapan	C=O	C=N	C-Cl
	- CH ₃	C=N	Sangat			C-O
N-H	- CH ₂	X=C=Y	Sedikit		C=C	C-N
		(C,O,N,S)	- C≡C, - C≡N		(aromatik dan alifatik)	C-C
2,5	4	5	5,5	6,1	6,5	15,4
Panjang gelombang dalam mikrometer						

Spesifikasi serapan senyawa berdasarkan gugus fungsi menurut Kristianingrum, (2016) meliputi;

1. Alkana, serapan utama yang akan tampak dalam spektra IR alkana disebabkan oleh stretching C-H di daerah $2850 - 3000 \text{ cm}^{-1}$, *scissoring* CH₂ dan CH₃ di

daerah $1450 - 1470 \text{ cm}^{-1}$, *rocking* CH_3 pada kurang lebih $1370 - 1380 \text{ cm}^{-1}$ dan pita *rocking*, pada $720 - 7725 \text{ cm}^{-1}$.

2. Alkena, rantai ini memiliki sifat yang lebih kuat dari alkana, maka alkena sulit bervibrasi. Sehingga, biasa terdeteksi serapannya pada daerah $3050 - 3150 \text{ cm}^{-1}$ atas keberadaan satu hidrogen yang menempel pada ikatan rangkap dua. Untuk *stretching* $\text{C}=\text{C}$ berada di daerah $1645 - 1670 \text{ cm}^{-1}$.
3. Alkuna dan Nitril. Alkuna menunjukkan pita *stretching* $\text{C}-\text{H}$ yang tajam pada $3300 - 3320 \text{ cm}^{-1}$ dan bentuk *bending* pada $600 - 700 \text{ cm}^{-1}$. Sedangkan *stretching* $\text{C}=\text{N}$ (nitril) pada alkuna terbaca pada $2100 - 2140 \text{ cm}^{-1}$ dengan intensitas sedang. Untuk *stretching* $\text{C}\equiv\text{C}$ alkuna dalam berupa serapan lemah yang terjadi pada $2200 - 2260 \text{ cm}^{-1}$.
4. Alkil halida. Ciri absorpsi alkil halida yakni serapan pita yang disebabkan oleh *stretching* $\text{C}-\text{X}$, $1000 - 1350 \text{ cm}^{-1}$ untuk $\text{C}-\text{F}$, $\text{C}-\text{Cl}$ pada $750 - 850 \text{ cm}^{-1}$, $500 - 680 \text{ cm}^{-1}$ milik $\text{C}-\text{Br}$ serta $200 - 500 \text{ cm}^{-1}$ untuk $\text{C}-\text{I}$.
5. Alkohol dan Eter. Alkohol dan eter memiliki ciri absorpsi infra merah disebabkan *stretching* $\text{C}-\text{O}$ didaerah $1050 - 1200 \text{ cm}^{-1}$, namun *stretching* $\text{O}-\text{H}$ alkohol terjadi di daerah $3200 - 3600 \text{ cm}^{-1}$.
6. Aldehid dan Keton. Kedua senyawa ini bervibrasi atas *stretching* $\text{C}=\text{O}$ karena gugus karbonil yang sangat polar dan momen dipol yang cukup besar, sehingga membentuk spektra dengan intensitas tinggi. Aldehid jenuh sederhana, serapannya terjadi pada 1725 cm^{-1} .

3.12. Uji Kepekaan Senyawa Anthraquinone

3.12.1 Analisis Senyawa Anthraquinone menggunakan BACTEC MGIT 960

Uji kepekaan menggunakan instrumen BD BACTEC (Becton, Dickinson, and Company, NJ USA) memiliki kecepatan dan keakuratan hasil analisis yang tinggi. Difasilitasi dengan 7 mL media cair *Mycobacterium Growth Indikator Tube* (MGIT) yang mengandung *Middlebrook 7H9 broth base*, serta 110 uL indikator fluoresensi

yaitu tris 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroine ruthenium chloride pentahydrate dalam basis karet silikon, WHO merekomendasikan *Drug Susceptibility Testing* untuk mempermudah biakan bakteri (Setiarsih, et al 2012). *Mycobacterium Growth Indikator Tube* (MGIT) mengurangi waktu pertumbuhan bakteri bila dibandingkan dengan metode lainnya seperti Lownstein Jensen (LJ). Kit SIRE disesuaikan dengan langkah percobaan, pertama dilakukan uji *susceptibility* terhadap berbagai lini OAT kemudian analisis MDR-TB dari senyawa yang diidentifikasi dalam penelitian. Aktivitas antibakteri bisa dipastikan dalam masa inkubasi bakteri selama 14 hari, dengan rata-rata nilai sensitif pada hari ke 9 (Rukminiati, 2012).

3.12.2 Analisis Senyawa Anthraquinone menggunakan Difusi Cakram

Metode difusi cakram merupakan metode yang banyak digunakan dalam uji aktivitas antimikroba suatu antibiotik atau senyawa kimia tertentu. Kepekaan mikroorganisme patogen akan terlihat dari luas dan ukuran zona bening pada media agar, yaitu area bening disekeliling kertas cakram (*paper disc*) atas eksresi zat penghambat pertumbuhan bakteri yang dianalisis (Byod 1995). Kelebihan dari metode ini adalah prosesnya cepat dimana hasil bisa dideteksi setelah inkubasi selama 24 jam pertama, kemudian efektif juga efisien yaitu tidak memerlukan banyak volume untuk zat yang akan dianalisis karena hanya dibiarkan meresap dalam *disc*. Menurut Lewis (2011), yang menyebabkan terjadinya penghambatan bakteri pada metode ini adalah saat *disc* diletakkan pada permukaan media agar, keberadaan senyawa mengganggu keutuhan membran sel, menghambat kerja enzim, mengganggu sintesis protein dan asam nukleat, serta menghambat regenerasi dinding sel.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain timbangan analitik, spatula, gelas beaker 1000 mL; 250 mL; 100 mL; dan 50 mL (Iwaki), gelas ukur 1000 mL dan 100 mL (Iwaki), pipet volume 10 mL (Iwaki), pipet ukur 10 mL; 2 mL dan 1 mL (Iwaki), labu erlenmeyer 1000 mL; 500 mL dan 250 mL (Iwaki), tabung reaksi 25 mL (Iwaki), corong pisah, statif dan klem, tabung ependorf 25 ml, botol McCartney, bunsen, power pipet, vial, cawan petri, kolom SEP-PAK C18, *freezer*, pipet tetes, mikropipet, autoklaf, magnetik stirer, corong gelas, pinset, penggaris, *incubator*, *vacuum rotary evaporator*, *orbital shaker* (Thermo Scientific), *KLT chamber*, *biosafety cabinet* (laminar), rak AST, vortex (Thermo), *Freeze Dry* (CHIRST Alpha 1-4 LDplus), sistem BACTEC MGIT 960, Spektrofotometer UV-VIS (SHIMADZU), Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) (Shimadzu LC-20AD) serta Spektroskopi Inframerah Transformasi Fourier (FTIR) PerkinElmer.

4.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Selada hijau kriting (*Lactuca sativa* L.), *anthraquinone* teknis (MERCK 98%), metanol p.a (CH₃OH), etanol (C₂H₅OH) p.a, etil asetat (C₄H₈O₂), aquades, diklorometana (CH₂Cl₂), amoniak (NH₃), larutan *2,2-diphenyl-1-picrylhidrazyl* (DPPH), kloroform (CHCl₃), toluena (C₇H₈), asam asetat anhidrat (CH₃COOH), n-Heksana (C₆H₁₄), asam sulfat (H₂SO₄), kalium hidroksida (KOH) 10%, serum sulfat, KOH 5 N, Plat Si-PF₂₄₅ ukuran 20 x 20 cm, larutan NaCl, Middlebrok 7H9 (MGIT), PANTA suplemen, *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv, bakteri *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus Aureus*, *Streptococcus pyogenes*, antibiotik isoniazid, *streptomycin*, *rifampicin*, *moxifloxacin*, *levofloxacin*, *ampicillin*, *eritromycin* alkohol 70%, nutrien

agar (NA), Müller Hinton *broth* (MHB), darah (domba), tips, kertas saring, kapas steril (berlidi), plastik wrap, serta aluminium foil.

4.3. Cara Kerja

4.3.1. Preparasi Sampel Ekstrak Selada Hijau (*Lactuca sativa* L.)

Sebanyak 12 kg tanaman selada hijau segar dipisahkan dari akar dan batangnya, dicuci dengan air mengalir, setelah bersih kemudian ditempatkan dalam labu alas bulat dan dikumpulkan dalam wadah plastik. Daun selada diberi perlakuan kriogenik (pembekuan) pada suhu -80°C selama kurang lebih 4 – 24 jam. Segera sebelum ekstraksi dan analisis, kadar air daun selada dihilangkan dengan metode *freeze drying*. Tanaman selada hijau terlebih dahulu di determinasi di Laboratorium Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia Pusat Penelitian Konservasi Tumbuhan dan Kebun Raya - LIPI guna membuktikan morfologi tanaman sebagai sampel utama penelitian.

4.3.1.1. Pembuatan Ekstrak Aquades (Aq)

20 g serbuk daun selada diekstraksi dengan pelarut aquades (Aq) dalam rasio perbandingan 1:20 (w/v) pada suhu ruang selama 24 jam menggunakan *orbital shaker*. Setelah itu, ekstrak aquades yang diperoleh disaring dengan menggunakan kertas saring Whatman #1. Semua ekstrak aquades yang telah disaring disimpan ke dalam *freezer*.

4.3.1.2. Pembuatan Ekstrak Metanol (MeOH)

20 g serbuk daun selada diekstraksi dengan pelarut metanol (MeOH) absolut dalam rasio perbandingan 1:20 (w/v) pada suhu 27°C selama 24 jam menggunakan *orbital shaker*. Setelah itu, ekstrak metanol yang diperoleh disaring dengan menggunakan kertas saring Whatman #1. Semua ekstrak metanol yang telah disaring disimpan ke dalam *freezer*.

4.3.1.3. Pembuatan Ekstrak Etanol (EtOH)

20 g serbuk daun selada diekstraksi dengan pelarut etanol (EtOH) dalam rasio perbandingan 1:20 (w/v) pada suhu ruang selama 24 jam menggunakan *orbital shaker*.

Setelah itu, ekstrak etanol yang diperoleh disaring dengan menggunakan kertas saring Whatman #1. Semua ekstrak etanol yang telah disaring disimpan ke dalam *freezer*.

4.3.1.4. Pembuatan Ekstrak Etil Asetat (Ea)

20 g serbuk daun selada diekstraksi dengan pelarut etil asetat (Ea) dalam rasio perbandingan 1:20 (w/v) pada suhu ruang selama 24 jam menggunakan *orbital shaker* (Su dkk, 1973). Setelah itu, ekstrak etil asetat yang diperoleh disaring dengan menggunakan kertas saring Whatman #1. Semua ekstrak etil asetat yang telah disaring disimpan ke dalam *freezer*.

4.3.2. Identifikasi Ekstrak Selada Hijau (*Lactuca sativa* L.)

Menurut Kristanti (2006); Edziri (2011); Fitriyanawati (2017); serta Rohmah (2019); identifikasi glikosida *anthraquinone* (AQ) ekstrak daun selada (*Lactuca sativa* L.) dilakukan dengan dua (2) metode;

- a. Metode (1) yaitu uji Borntrager, sebanyak 30 mg ekstrak ditambah 10 mL aquades, disaring, kemudian filtrat diekstrak dengan 3 ml toluena menggunakan corong pisah, proses ekstraksi dilakukan dengan 2 kali pengulangan, fase toluena terpisah sebagai larutan A dan B. Larutan A sebagai pembanding, dan larutan B ditambahkan dengan ammonia, diamati perubahan warna larutan.
- b. Uji identifikasi dilakukan juga dengan metode Borntrager modifikasi (2), 30 mg ekstrak ditambahkan dengan KOH 5 N dan 1 mL H₂SO₄ encer. dipanaskan dalam waterbath selama 10 menit, kemudian didinginkan dan disaring, diasamkan dengan asam asetat glasial, dan diekstraksi cair-cair dengan 5 mL toluena. Hasil ekstrak dibagi menjadi 2 bagian, A dan B. Larutan A digunakan sebagai blangko sedangkan lapisan toluena (B) dipisahkan dan ditambahkan ammonia untuk mengubah keadaan menjadi basa, diamati perubahan warna larutan.

Hasil positif identifikasi AQ ditunjukkan jika pada lapisan ammonia terbentuk warna merah atau merah muda.

4.3.3. Penentuan Kadar *Anthraquinone* (AQ) dengan Metode Kalibrasi Standar

Penentuan kadar AQ menggunakan metode kalibrasi standar yang dimodifikasi menggunakan instrumen Spektrofotometer UV-VIS. Penentuan Panjang gelombang maksimum ditentukan dengan cara memasukan 2 mL larutan standar AQ 1000 ppm kedalam kuvet. Standar dibuat dengan melarutkan 50 mg AQ teknis yang dilarutkan menggunakan etanol 96% hingga volume 50 mL. Rentang absorbansi maksimum dan panjang gelombang maksimum dilakukan pada daerah 200 – 400 nm. Kemudian standar AQ diencerkan menjadi 100; 50; 25; 10 dan 5 ppm dengan mengambil larutan induk 1000 ppm berturut-turut untuk setiap konsentrasi yaitu 1; 0,5; 0,25; 0,1; dan 0,05 mL kemudian dilarutkan kembali menggunakan 96% etanol hingga volume 10 mL. Untuk penentuan kadar total AQ dalam sampel ekstrak dilakukan dengan cara membuat larutan konsentrasi 1000 ppm yakni mencampurkan; 10 mg ekstrak sampel (Aquadess, Metanol, Etanol dan Etil asetat) kemudian dilarutkan dengan etanol p.a hingga tanda batas menjadi 10 ml. Larutan dihomogenisasi dan dianalisis pada panjang gelombang 250 nm. Selama pembacaan diperoleh nilai absorbansi untuk dapat menentukan kadar total AQ pada setiap ekstrak menggunakan kurva kalibrasi standar. Hasil tertinggi dari salah satu ekstrak kemudian dilanjutkan untuk uji daya antioksidan dan pemisahan kolom kromatografi serta kromatografi lapis tipis.

4.3.4. Uji Daya Antioksidan dengan DPPH

Pengujian daya antioksidan DPPH dari ekstrak daun selada ditentukan menurut Yen dan Chen (1995) menggunakan Spektrofotometer UV-VIS. Pertama, larutan DPPH 50 ppm dibuat dengan cara mencampurkan 2,5 mg serbuk DPPH kedalam 50 mL metanol. Ditentukan panjang gelombang maksimum percobaan dengan memasukan 2 mL metanol p.a. dan 1 mL larutan DPPH 50 ppm kedalam kuvet. Rentang panjang gelombang maksimum dibaca pada daerah 400 – 600 nm. Untuk penentuan % inhibisi; dilarutkan 10 mg setiap ekstrak sampel dalam 100 mL etanol, kemudian dibuat variasi konsentrasi ekstrak sampel yakni 7; 9; 11; dan 13 ppm. 2 mL masing – masing konsentrasi ekstrak dicampurkan dengan 2 mL larutan DPPH 50 ppm.

Larutan dihomogenisasi serta diinkubasi dalam suhu ruang selama 30 menit untuk terakhir dianalisis pada panjang gelombang maksimum terbaca. Persentase inhibisi yang diperoleh dihitung berdasarkan perbandingan sebagai berikut:

$$(\%) \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Abscontrol} - \text{Abssample}}{\text{Abscontrol}} \times 100$$

Nilai IC_{50} (mg ekstrak/mL) merupakan konsentrasi inhibisi dimana radikal DPPH diurai sebesar 50% dan diperoleh dengan interpolasi dari analisis regresi linier sebagai perbandingan kontrol positif. Ekstrak dengan nilai IC_{50} terkecil dilanjutkan untuk pemisahan senyawa metode kolom kromatografi.

4.3.5. Isolasi *Anthraquinone* (AQ) dari Ekstrak Selada Hijau (*Lactuca sativa*)

4.3.5.1. Isolasi *Anthraquinone* (AQ) dengan Kromatografi Kolom

Optimasi penggunaan eluen kromatografi kolom dilakukan menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT) plat (TLC60 F254) dimana fase gerak yang digunakan adalah n-Heksan : Etil asetat (2:1) serta diklorometana : metanol (5:1). Eluen dibiarkan merambat naik hingga tanda batas atas, selanjutnya plat di semprotkan reagen serum sulfat dan dipanaskan untuk memperoleh warna atau memunculkan bercak senyawa yang terkandung dalam ekstrak. Secara umum, Metode ini berfungsi sebagai uji kualitatif yang akan divisualisasikan dibawah cahaya UV dengan panjang gelombang 254 nm. Pada isolasi kolom kromatografi ekstrak sampel dihomogenkan dengan *celite* sebagai katalis. Kolom dipasang pada statif dan klem secara tegak lurus, silika gel dimasukkan kedalamnya sebagai media pemisah (fasa diam) guna selanjutnya dielusi menggunakan metode gradien. Pemisahan terjadi dengan mengeluarkan eluen melalui kran kedalam botol berukuran 50 ml. Ekrstrak dipisahkan dengan eluen n-Heksan : Etil asetat (10:1; 5:1, dan 2:1) untuk terakhir dielusi dengan eluen Etil asetat. Diperoleh hasil fraksi senyawa dengan pigmen warna berbeda untuk selanjutnya diuapkan hingga kering.

4.3.5.2. Isolasi *Anthraquinone* (AQ) dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Berdasarkan Muhsin dan Shami (2015), serta Xu (2012) isolasi AQ dalam tanaman bisa dilakukan menggunakan metode Kromatografi lapis tipis. Hasil fraksi yang diperoleh di visualisasikan dan kembali dipisahkan dengan kromatografi lapis tipis (KLT) untuk mendeteksi keberadaan senyawa isolat AQ murni. Fase gerak yang digunakan yaitu diklorometana : metanol (5:2) kemudian disemprotkan dengan reagen KOH 10 % sebagai penimbul bercak AQ, noda berwarna coklat-jingga, jingga ataupun merah menandakan eksistensi senyawa AQ. Ditentukan nilai *retardation factor* (RF) noda fraksi senyawa yang sejajar dengan area noda standar AQ dan dianggap sebagai AQ dari selada untuk selanjutnya ditandai sebagai isolat AQ yang akan dikarakterisasi dan dianalisis uji antibakteri.

4.3.6. Penentuan *Anthraquinone* (AQ) menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

4.3.6.1. Pembuatan Larutan Induk *Anthraquinone* (AQ)

Gelas beaker 1000 mL, dimasukan Metanol : Air (8:2) sebagai fase gerak. 1,5 mg AQ teknis (kemurnian 98%) dilarutkan dalam 1,5 mL metanol untuk menghasilkan konsentrasi akhir 1000 ppm.

4.3.6.2. Pembuatan Larutan Standar *Anthraquinone* (AQ)

Untuk deret standar, di pipet 750 μ L; 375 μ L; 150 μ L; 75 μ L; 37,5 μ L; 15 μ L dan 7,5 μ L larutan AQ dimasukan kedalam vial 1 mL guna pengenceran larutan menjadi 500; 250; 100; 50; 25; 10 dan 5 ppm kemudian ditambahkan metanol sampai tanda batas. Larutan dibuat dengan tujuan sebagai pembanding sampel sedangkan batas *range* konsentrasi untuk mempermudah pembacaan elusi senyawa dan proses perhitungan kadar.

4.3.6.3. Analisis *Anthraquinone* (AQ) pada Isolat Etil Asetat (Ea)

60 mg isolat Ea dilarutkan menggunakan metanol dalam eppendorf 10 mL dan ditambahkan hingga tanda batas kemudian divortex dengan kecepatan tinggi (175

rotasi permenit) selama 15 menit untuk membuat konsentrasi 6000 ppm. Setelah itu dibuat konsentrasi 2500 ppm, diambil larutan stok sebanyak 625 μ l lalu dicukupkan hingga 1,5 ml menggunakan pelarut yang sama, dan pada konsentrasi 1000 ppm diambil larutan stok 250 μ l dalam 1,5 ml metanol. Sampel disaring melalui filter jarum suntik Teflon 0,45 μ m ke dalam vial HPLC coklat, dan ditutup untuk analisis. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) diatur menggunakan detektor panjang gelombang 325 nm dan 254 nm dengan elusi isokratik, kolom *Keystone* ODS/H 250 x 4.6 mm, 5 μ m memiliki ketelitian tinggi dengan volume injeksi 10 μ L (laju alirnya 1 mL/menit). Kromatografi fase terbalik, mengakibatkan senyawa polar cenderung terelusi lebih dulu sedangkan senyawa kurang polar akan teradsorpsi (terjerap) lebih lama didalam kolom. Dimasukan larutan standar dan sampel kemudian posisikan pada keadaan LOAD. Secara proses sampel akan diinjeksikan bergantian untuk bisa masuk kedalam kolom dibantu oleh fase gerak berupa 80% metanol dan 20% air serta adanya pompa bertekanan tinggi. Komponen yang berinteraksi dengan fasa diam secara kuat akan bergerak lebih lambat (distribusinya), dimana waktu elusi dilakukan selama 18 menit. Dibuat kurva kalibrasi dan dihitung kadar AQ sebagai analisis kuantitatif dari isolat selada hijau.

4.3.7 Penentuan Struktur *Anthraquinone* (AQ) Terkonfirmasi *Fourier Transform Infra Red* (FTIR)

Spektra FTIR dihasilkan dari spektroskopi Inframerah transformasi fourier PerkinElmer version-10 UATR. Sampel isolat kering ditempatkan dalam cawan porselen, dihomogenkan dengan plat KBR kemudian sampel dipress menggunakan alat PIKE tekanan 80 newton. Sampel diposisikan kedalam sampel holder sampai seluruh bagian diamond tertutup. Setelah itu semua akuisisi dan pemrosesan data dilakukan dengan Software QUANT+ PerkinElmer *spectrum one* FTIR. Karakterisasi ini bertujuan untuk mengetahui gugus fungsi sebagai data interpretasi struktur senyawa turunan *anthraquinone* (AQ).

4.3.8. Anthraquinone (AQ) sebagai Anti Antibakteri

Penentuan aktifitas anti bakteri dari senyawa *anthraquinone* (AQ) dilakukan dengan konfirmasi *Drug Susceptibility Testing* (DST) menggunakan instrumen BACTEC MGIT 960 (WHO, 2018) untuk MTB strain H37Rv serta metode difusi cakram untuk uji bakteri *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus Aureus*, *Streptococcus pyogenes*.

4.3.8.1. Pembuatan Stok Larutan Uji

4.3.8.1.1. Ekstrak Daun Selada Hijau

Ekstrak uji ditimbang seksama sebanyak 40 mg dan dimasukkan ke dalam wadah vial. Ekstrak dilarutkan menggunakan metanol sebanyak 8 ml, kemudian dihomogenkan dengan vortex. Sampel disimpan sebagai larutan stok ekstrak 5000 ppm. Setelah itu dibuat konsentrasi 2500 ppm, diambil larutan stok sebanyak 750 μ l lalu dicukupkan hingga 1,5 ml menggunakan metanol, dan pada konsentrasi 1000 ppm diambil larutan stok 300 μ l lalu cukupkan hingga 1,5 ml.

4.3.8.1.2. Isolat Anthraquinone (AQ) dari Daun Selada Hijau

Stok isolat uji 6000 ppm diencerkan, dibuat konsentrasi 2500 ppm dengan mengambil larutan stok sebanyak 625 μ l lalu dicukupkan hingga 1,5 ml menggunakan metanol, selain itu dibuat pula konsentrasi 1000 ppm yakni sebanyak 250 μ l larutan stok dicukupkan dengan metanol hingga 1,5 ml.

4.3.8.2. Uji Sterilitas Sediaan Stok

Biafety cabinet (laminar) disterilkan selama 24 jam menggunakan sinar UV setelah penyemprotan alkohol 70%. Seluruh alat gelas yang akan digunakan disterilisasi dengan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit. Disiapkan media nutrisi agar (NA- oxoid), 15 g ke dalam 500 ml aquades dan dididihkan sambil terus diaduk. Setelah mendidih media disimpan dalam *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit kemudian ditambahkan darah segar (steril) dan kembali dihomogenkan. Media NA dituang ke dalam cawan petri, dibiarkan sampai memadat. Ekstrak juga

isolat uji diinokulasikan dengan pola goresan zigzag ke dalam media yang telah memadat untuk mempermudah pengamatan. Proses inokulasi dilakukan menggunakan jarum ose yang telah disterilkan dengan cara dibakar diatas api bunsen. Inkubasi cawan petri secara terbalik selama 24 jam pada suhu 36°C. Diamati pertumbuhan mikroorganismenya.

4.3.8.3. Suspensi Bakteri

4.3.8.3.1. *Mycobacterium tuberculosis* Strain H37Rv

Proses peremajaan bakteri dilakukan dalam *biosafety cabinet* (laminar). Bakteri H37Rv disubkultur selama 3-5 hari, dengan cara memasukan 0,5 mL bakteri dari stok kultur kedalam media MGIT 7 mL dan di inkubasi selama 1x 24 jam. Pada hari kedua pengamatan, botol yang telah diinkubasi divortex sebagai proses homogenisasi. Larutan subkultur utama kemudian diencerkan dengan 4 mL larutan NaCl pada hari ketiga dan diamati pertumbuhannya hingga hari kelima. Tepat hari kelima pertumbuhan, disiapkan tabung MGIT baru 7 mL dan ditambahkan 0,8 ml *Growth supplement* PANTA, kedalamnya dimasukan 0,5 mL suspensi bakteri yang telah diencerkan. Tabung dibiarkan dalam suhu ruang selama 30 menit untuk selanjutnya bisa langsung digunakan dalam uji kepekaan senyawa (Siddiqi dan Gerdes, 2006).

4.3.8.3.2. *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus Aureus*, dan *Streptococcus pyogenes*

Pembuatan suspensi bakteri *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus Aureus* dan *Streptococcus pyogenes* kembali dilakukan dalam *biosafety cabinet* (laminar). Untuk setiap suspensi bakteri, sebanyak 0,13 gram *nutrien broth* dimasukan kedalam Erlenmeyer dan ditambahkan dengan 10 ml aquades kemudian dihomogenkan dan diautoklaf selama 2 jam pada suhu 121°C. Setelah dingin, larutan dimasukkan ke tabung reaksi steril. Kedalamnya ditumbuhkan bakteri sebanyak 1 *tube* sebagai proses subkultur. Tabung reaksi ditutup dengan plastik wrap dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu optimum pertumbuhan yaitu 37°C.

4.3.8.4. Uji Kepekaan Senyawa *Anthraquinone* (AQ)

4.3.8.4.1. Uji Kepekaan Senyawa *Anthraquinone* (AQ) dengan BACTEC 960

Disiapkan 5 tabung MGIT 7 mL untuk 4 sampel dan 1 *growth control* (GC). 0,8 mL PANTA supplement dimasukan kedalam setiap tabung dan ditambahkan 4 mL aquades kemudian dihomogenkan menggunakan vortex. 200 μ l larutan sampel yaitu ekstrak dan isolat konsentrasi 1000 ppm; dan 2500 ppm dilarutkan kedalam empat (4) tabung kecuali GC sebagai pembanding. Sebelum inokulasi bakteri, suspensi kembali diencerkan 1:100 dengan mengambil 0,1 mL MTB H37Rv kedalam 10 mL larutan NaCl steril, dihomogenkan. Setelah itu 500 μ l suspensi 1:100 di inokulasikan kedalam GC dan tabung sampel. Sesaat setelah homogen, tabung ditempatkan diatas rak rangkaian AST (*sequence*) untuk terakhir diposisikan pada instrumen BD BACTEC MGIT 960. Hasil pemeriksaan diperoleh setelah inkubasi 12-14 hari. Instrumen ini akan mengeluarkan sinyal merah (positif) bila *growth unit* (GU) dalam tabung terbaca pada nilai 400.

4.3.8.4.2. Uji Kepekaan Senyawa *Anthraquinone* (AQ) dengan Difusi Cakram

Metode uji aktivitas antibakteri selanjutnya menggunakan metode difusi cakram. Mula-mula disiapkan 0,42 g Müeller Hinton *Broth* (MHB) dan 0,56 mL nutrien agar (NA), kemudian ditambahkan 20 mL aquades dan diautoklaf selama 2 jam pada suhu 121°C. Larutan dituang kedalam cawan petri dan ditunggu hingga mengeras. Suspensi bakteri yang telah diremajakan 24 jam kemudian diambil menggunakan kapas (berlidi) lalu dioleskan diatas permukaan media. Setelah itu sampel senyawa yang dianalisis dibiarkan menyerap pada kertas saring dan diposisikan diatas media untuk uji aktivitas. Cawan petri selanjutnya ditutup dan direkatkan dengan plastik wrap serta diinkubasi pada suhu 37°C selama 24; 48 dan 72 jam. Besar diameter zona bening atau zona penghambatan diukur menggunakan penggaris.

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian Karakterisasi Senyawa *Anthraquinone* (AQ) dari Daun Selada Hijau (*Lactuca sativa* L.) telah dilakukan selama 6 bulan di Laboratorium Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) atau bagian dari Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN) Cibinong, Kabupaten Bogor. Uji aktivitas antibakteri Ekstrak dan isolat diidentifikasi pada bakteri strain spesifik MTB H37Rv, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus Aureus*, serta *Streptococcus pyogenes*. Daun selada hijau (*Lactuca sativa* L.) diperoleh dari perkebunan di Lembang, Bandung sebagai sampel utama penelitian untuk mengkonfirmasi keberadaan turunan senyawa *anthraquinone* (AQ) sehingga dapat berfungsi sebagai antibakteri atau senyawa penuntun antibiotik mengatasi permasalahan resistensi antimikroba.

5.1. Daun Selada Hijau (*Lactuca Sativa* L.)

5.1.1 Determinasi Tanaman

Tanaman selada hijau kriting (*Lactuca sativa* L.) baik daun disertai akar, juga batang diidentifikasi di Pusat Penelitian Konservasi Tumbuhan dan Kebun Raya - Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Bogor untuk memastikan kebenaran identitas tanaman dengan metode determinasi tanaman. Hasilnya¹ menunjukkan bahwa tanaman selada hijau yang digunakan adalah benar jenis *Lactuca sativa* L. (sinonim *Lactuca sativa* subsp. *crispa* (L.) schübl. & G.Martens, dari suku Asteraceae.

5.1.2 Preparasi Sampel Daun Selada Hijau (*Lactuca Sativa* L.)

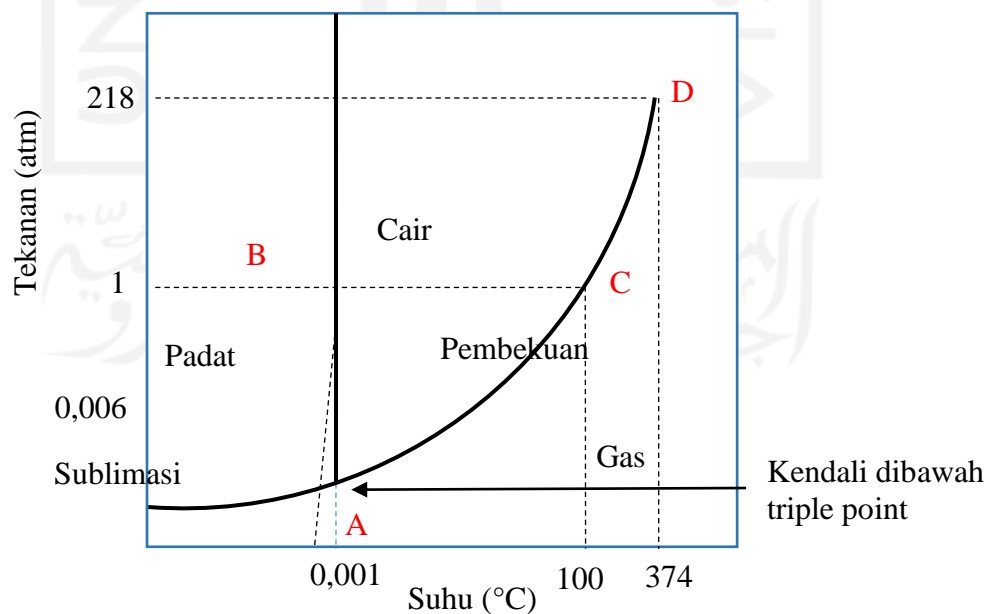
Penyediaan sampel penelitian dilakukan dengan memisahkan 12 kg daun selada dari akar juga batang tanaman kemudian dibersihkan dan dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan pengotor. Daun selada hijau disimpan kedalam alat gelas, dikumpulkan diatas wadah plastik dan dibekukan pada suhu -80°C selama 24 jam

¹ Surat hasil Determinasi **Lampiran 1.**

(semalaman), proses ini dilakukan guna mengurangi kerusakan sampel atau menghindari oksidasi tanaman atas kontaminasi udara yang dapat mempercepat *enzymatic browning* yaitu pencoklatan enzimatik pada buah/sayur. Menurut Moon *et al.* (2020), enzim pencoklatan bisa terjadi saat pemanenan, pengangkutan ataupun penyimpanan. Perlakuan fisik seperti mengupas, memotong, mengiris serta merobek buah/sayur pada temperatur tertentu membuat enzim yang juga disebut polifenol oksidase aktif.

5.1.3 Metode *Freeze Drying*

Perlakuan sebelumnya yaitu kriogenik (pembekuan) dengan penyimpanan pada suhu -80°C mempermudah pelaksanaan metode *freeze drying* atau pengeringan beku. Metode ini merupakan metode pengeringan termal yang dilakukan dengan suhu rendah dimana kandungan air didalam sampel dibekukan menjadi fase padat (es) kemudian diubah menjadi fase udara menggunakan prinsip sublimasi atas pengendalian suhu dan tekanan. Sublimasi terjadi ketika tekanan dan suhu permukaan es dibawah titik triple point terletak pada suhu $0,01^{\circ}\text{C}$ dan tekanan 0,61 kPa atau 0,006 atm (Sularz, 2020). Hal ini bertujuan agar gas yang terbentuk saat peningkatan suhu terbangun keluar.



Gambar 12. Diagram perubahan fase air

Keunggulan dari metode *freeze drying* adalah selama proses berlangsung, tidak ada pengurangan vitamin, mineral juga bahan aktif senyawa dari sampel dibandingkan dengan metode pengeringan termal suhu tinggi (Habibi dkk, 2019). Tahapan metode ini meliputi :

- a. *freezing*, yaitu pembekuan kembali sampel pada suhu -40°C bertujuan mengubah fase air menjadi fase padat (es).
- b. Proses dilanjutkan dengan *drying* atau pengeringan. Terdapat dua tahap pengeringan; *main-drying* bertujuan untuk menghilangkan kandungan air dari luar sel simplisia daun selada hijau, kemudian *final-drying* adalah tahap akhir untuk menghilangkan air dari dalam sel simplisia daun selada hijau.

Diperoleh daun selada hijau (*Lactuca sativa* L.) kering (tanpa kandungan air) setelah pengeringan beku selama 48 jam yang kemudian dihaluskan sampai menjadi serbuk menggunakan blender sebagai langkah memperbesar ukuran permukaan/pori sampel. Semakin besar diameter permukaannya, maka semakin besar kemampuan senyawa aktif terekstraksi keluar (terekstitasi) dari dinding sel daun selada hijau.

5.2. Ekstraksi Daun Selada Hijau (*Lactuca Sativa* L.)

Tahap pertama dalam mengidentifikasi senyawa *Anthraquinone* (AQ) sebagai pendamping antibakteri adalah ekstraksi. Metode ekstraksi yang digunakan yaitu perendaman dingin dan tertutup dalam kurun waktu tertentu, biasa disebut maserasi. Sejumlah kurang lebih 80 gram serbuk daun selada hijau dibagi menjadi 4 erlenmeyer dan dimaserasi dalam *incubator shaker* dengan agitasi 220 rpm pada suhu 16°C menggunakan 4 pelarut selama 24 jam, diantaranya; Aquades (Aq), Metanol (MeOH), Etanol (EtOH) serta Etil Asetat (Ea). Rasio perbandingan setiap ekstrak yaitu 1:20 (w/v), untuk merendam 20 gram serbuk kering daun selada hijau dibutuhkan pelarut sebanyak 400 mL. Metode ini dipilih karena mudah dilakukan dan tanpa pemanasan sehingga tidak membuat senyawa aktif yang terkandung dalam sampel rusak. Selain itu, pelarut yang digunakan bersifat tetap juga efisien tidak dikurangi ataupun tidak ditambahkan selama proses metode berlangsung.

Hasil maserat masing-masing pelarut disaring, ekstrak dipisahkan dari pelarut menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada kecepatan rotasi 4 dengan pompa vakum 80 kPa sehingga diperoleh 2,95 gram ekstrak kering Aquades; 2,76 gram ekstrak kering metanol; 2,13 gram ekstrak kering etanol serta 2,98 gram ekstrak kering etil asetat. Penggunaan variasi pelarut bertujuan untuk mengetahui efektifitas kepolaran pelarut dalam mengekstrak senyawa target AQ yang merupakan senyawa polar. Tingkat kepolaran pelarut diurutkan dari semi polar sampai yang paling polar yaitu Etil Asetat (Ea) – Etanol (EtOH) – Metanol (MeOH) – Aquades (Aq). Dalam penelitian ini daun selada hijau efektif dan efisien diekstraksi menggunakan pelarut etil asetat (Ea), tingginya rendemen² ekstrak Ea sebesar 14,9% menunjukkan bahwa pelarut semi polar ini mampu mengekstraksi senyawa aktif dari daun selada hijau lebih optimum dibandingkan dengan pelarut universal lainnya. Etil asetat (Ea) juga merupakan pelarut dengan toksisitas rendah yang mudah diuapkan.

5.3. Identifikasi Ekstrak Daun Selada Hijau (*Lactuca Sativa L.*)

Mengacu pada penelitian Kristanti (2006); Edziri (2011); Fitriyanawati (2017); serta Rohmah (2019), identifikasi senyawa AQ terhadap ekstrak daun selada hijau (*Lactuca sativa L.*) dibedakan dalam metode Borntrager dan Borntrager modifikasi. Metode uji ini bisa mendeteksi keberadaan AQ, tetapi akan menunjukkan negatif pada AQ yang sangat stabil atau juga pada turunan glikosida AQ tereduksi dari jenis antranol (Evans dan Evans, 2009). Tujuan dilakukannya kedua metode adalah untuk memastikan keberadaan senyawa AQ secara kualitatif sekaligus membandingkan apakah hasil metode borntrager sesuai dengan hasil metode borntrager yang dimodifikasi. Hasil³ standar AQ teknis (MERCK 98%) dijadikan sebagai referensi utama identifikasi dalam setiap ekstrak daun selada hijau (*Lactuca sativa L.*).

² Tabel perhitungan rendemen **Lampiran 9.**

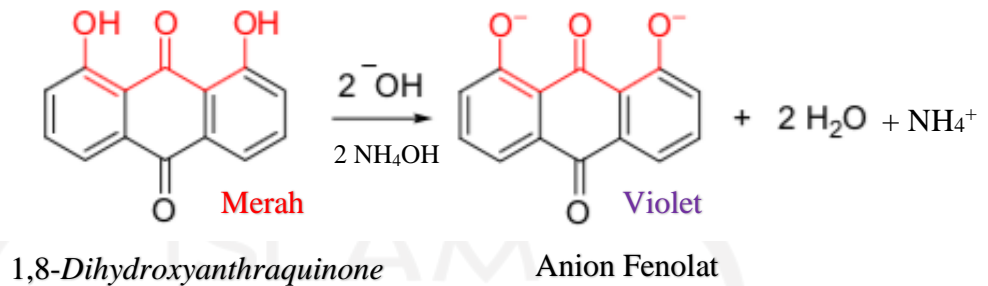
³ Gambar Hasil Identifikasi AQ **Lampiran 12.**

Tabel 6. Hasil identifikasi *anthraquinone* (AQ)

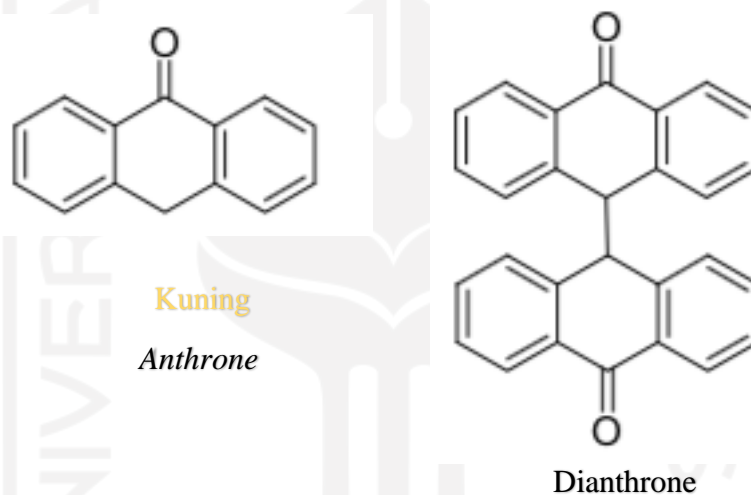
Sampel	Metode Borntrager	Metode Borntrager Modifikasi
Standar AQ (Teknis)	++++	++++
Ekstrak Aq	+++	+
Ekstrak MeOH	++	++
Ekstrak EtOH	+	++++
Ekstrak Ea	+	+++

Keterangan : (+) = Hasil kurang sesuai dengan standar, positif AQ
 (++) = Hasil sedikit sesuai dengan standar, positif AQ
 (+++) = Hasil sesuai dengan standar, positif AQ
 (++++) = Hasil standar, positif AQ

Pada metode borntrager, 30 mg ekstrak ditambahkan aquades sebagai langkah awal identifikasi karena AQ larut dalam air ataupun alkohol. Larutan disaring kemudian ditambahkan dengan toluen sebagai proses ekstraksi cair-cair. Ekstraksi cair-cair yaitu pemisahan senyawa diantara 2 fasa pelarut yang tidak saling bercampur dimana sebagian komponen larut pada fasa pertama dan komponen lainnya larut dalam fasa kedua, tujuannya untuk memisahkan AQ dari senyawa non polar yang mungkin masih ada didalam ekstrak dan bisa terikat dengan toluena. Setelah itu amoniak ditambahkan kedalamnya kemudian digojok. Gugus hidroksil yang terletak pada C-1 dan C-8 dari 1,8-*Dihydroxyanthraquinone* memiliki tingkat keasaman yang sebanding dengan asam karboksilat, dalam hal ini terjadi reaksi hidrolisis dengan penambahan alkali sehingga menghasilkan senyawa anion fenolat berwarna ungu dan hijau atau langsung teridentifikasi sebagai 1,8-*Dihydroxyanthraquinone* berwarna merah, sedangkan *anthrones* dan *dianthrones* yaitu ring anthraquinone membuat larutan berwarna kuning yang kemudian akan segera berubah menjadi merah saat teroksidasi (Muñoz, *et al* 2018).



Gambar 13. Reaksi 1,8-Dihydroxyanthraquinone menjadi anion fenolat



Gambar 14. Struktur *anthrone* dan *dianthrone*

Terjadi perubahan warna larutan pada metode Borntrager yakni ekstrak Aq berwarna orange kemerahan, ekstrak MeOH berwarna kuning disertai cincin merah (pada bagian tengah atas), ekstrak EtOH berwarna kuning muda, serta ekstrak Ea berwarna kuning gelap atau kehijauan dibagian atas larutan. Keseluruhan ekstrak mengandung senyawa AQ, ekstrak yang memiliki kadar AQ lebih tinggi adalah ekstrak Aq sesuai warna larutan standar AQ teknis dengan metode yang sama. Pada metode Borntrager modifikasi yang dilakukan dengan reaksi oksidasi menggunakan KOH kemudian ditambahkan asam sulfat encer. Hasil perubahan warna larutan meliputi; ekstrak Aq berwarna orange kemerahan, ekstrak MeOH berwarna kuning kehijauan,

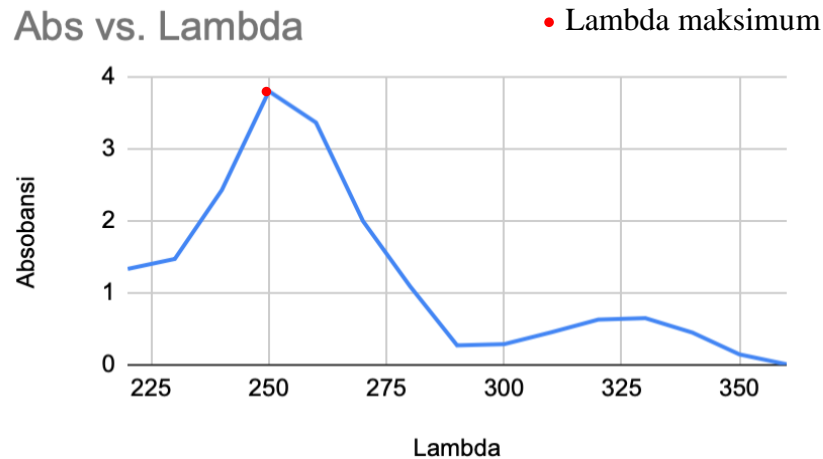
sedangkan ekstrak EtOH dan Ea berwarna putih tulang seperti standar teknis AQ hasil uji identifikasi metode Borntrager modifikasi. Perubahan warna putih tulang pada larutan ini menunjukkan tingginya kestabilan AQ pada sampel (EtOH dan Ea) maupun standar, sehingga diperkirakan senyawa turunan AQ terbaca pada perubahan warna orange dan kuning. Pemilihan ekstrak untuk analisis selanjutnya dibuktikan kembali secara kuantitatif dengan metode kalibrasi standar menggunakan instrumen Spektrofotometer UV-Vis.

5.4. Metode Kalibrasi Standar *Anthraquinone* (AQ)

Kurva kalibrasi merupakan model persamaan regresi, digunakan untuk memprediksi konsentrasi analit yang tidak diketahui atas respon suatu instrumen terhadap standar senyawa yang diketahui (Moosavi dan Ghassabian, 2018). Metode bioanalitikal ini menunjukkan variabel terikat berupa konsentrasi serta variabel independent yang dalam penelitian berupa hasil absorbansi instrumen spektrofotometer UV-VIS. Senyawa AQ tertinggi dari 4 maserat ekstrak diidentifikasi dan dipastikan kadarnya secara kuantitatif menggunakan metode kalibrasi standar atau kurva kalibrasi.

5.4.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Perlakuan ini bertujuan untuk memperoleh nilai panjang gelombang maksimum larutan standar AQ 1000 ppm sebagai panjang gelombang (λ) pada analisis sampel ekstrak dengan senyawa AQ total tertinggi, sehingga nilai absorbansi yang dihasilkan optimum dan berada pada serapan akurat. Hukum Lambert-Beer mendasari hal ini, dimana nilai absorbansi yaitu linier atau berbanding lurus dengan nilai konsentrasi. Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan dengan cara mengukur serapan larutan standar AQ 1000 ppm pada daerah panjang gelombang Ultraviolet (UV) yaitu 200 – 400 nm, selisih pengukuran adalah per-10 nm.

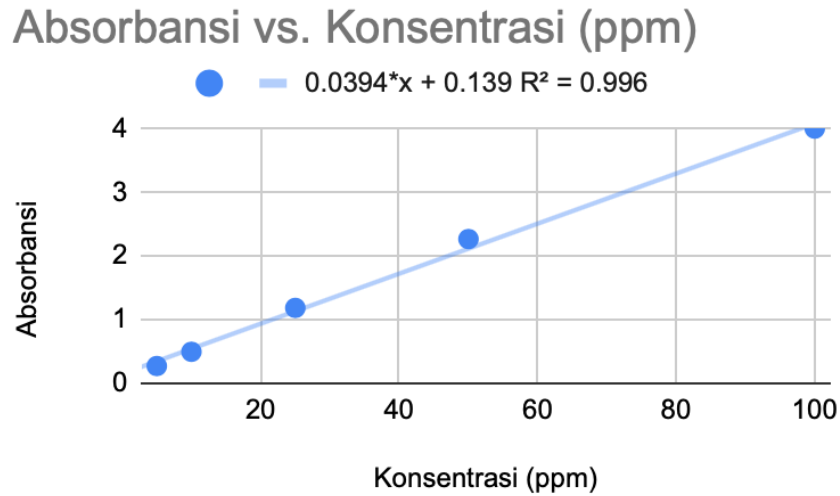


Gambar 15. Spektra Panjang gelombang maksimum standar AQ

Panjang gelombang maksimum standar AQ terdeteksi pada 250 nm dan nilai absorbansinya adalah 3,789. Daerah serapan hasil akurat dengan literatur karena karakteristik keberadaan ikatan rangkap terkonjugasi dari senyawa AQ memiliki absorbansi maksimum pada 248-254 nm (Mūnoz, *et al* 2018).

5.4.2 Analisis Sampel Ekstrak

Pengujian ekstrak sampel bertujuan untuk memilih salah satu diantara keempat ekstrak senyawa yaitu; ekstrak Aq, ekstrak MeOH, ekstrak EtOH serta ekstrak Ea yang memiliki kadar AQ tertinggi, sehingga tahap isolasi senyawa bisa efektif dan efisien. Sebelum identifikasi kadar sampel ekstrak dilakukan, larutan standar AQ divariasikan konsentrasinya menjadi; 100; 50; 25; 10; dan 5 ppm, hasil absorbansi yang diperoleh dari standar AQ berturut-turut adalah 4,000; 2,261; 1,176; 0,486; dan 0,261. Diplot grafik kurva standar (kurva kalibrasi) dan didapatkan persamaan garis $y = 0,0394x + 0,139$ dengan R^2 0,996. Nilai linieritas mendekati angka 1 menyatakan korelasi yang tinggi antara analit (x) yaitu variasi konsentrasi standar yang dibuat terhadap respon instrumentasi (y) sehingga hasil persamaan regresi bisa dijadikan sebagai penentu kadar AQ total pada ekstrak secara akurat.



Gambar 16. Spektra Absorbansi vs Konsentrasi

Secara kuantitatif penentuan kadar total AQ ekstrak selada hijau dihitung berdasarkan absorbansi terbaca pada instrumen spektrofotometer UV-VIS sebagai (y).

Tabel 7. Kadar ekstrak selada hijau

Ekstrak Sampel	Absorbansi	Kadar (ppm)
Ekstrak Aq	0,117	16,1538
Ekstrak MeOH	0,144	29,6923
Ekstrak EtOH	0,096	15,1795
Ekstrak Ea	0,214	33,9744

Serapan hasil seluruh ekstrak memiliki selisih signifikan. Ekstrak Ea terbaca dengan serapan tertinggi yaitu 0,214 menghasilkan kadar 33,9744 ppm sedangkan serapan terendah ada pada ekstrak etanol 0,096 dimana hasil kadarnya hanya 15,1795 ppm. Nilai ini menunjukkan kadar total AQ dominan terekstraksi dari pelarut Ea mengikuti prinsip *Like dissolve like*. Pelarut universal yaitu EtOH, MeOH, dan Aq cenderung dapat melarutkan senyawa polar dan non polar sehingga efektivitas penarikan senyawa AQ tidak optimum dibandingkan pelarut Ea yang merupakan

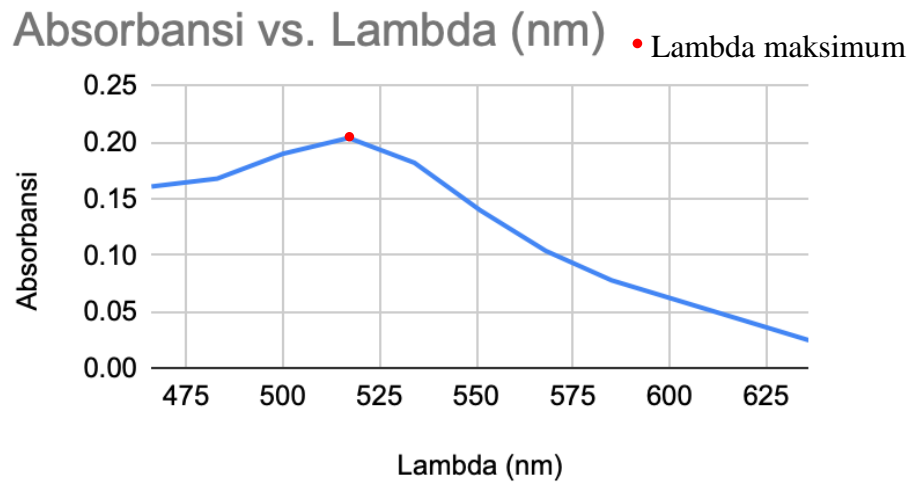
pelarut semi polar dengan kemampuan melarutkan senyawa polar dan semi polar. AQ bisa diklasifikasikan juga sebagai senyawa semi polar karena keberadaan cincin benzen bersifat non polar serta gugus karbonil dan hidroksil yang sangat polar. Kesesuaian pelarut sangat mempengaruhi hasil kadar total AQ. Selain itu, proses setelah maserasi seperti penguapan pelarut (*vacum rotary*) juga berpengaruh dalam pengurangan kadar AQ ekstrak mengingat AQ adalah senyawa yang sebaiknya terhindar dari pemanasan dengan suhu tinggi serta pemanasan berulang atau terus-menerus (SDS, 2021). Menurut penelitian yang dilakukan oleh Insanu, *et al* (2019) senyawa turunan AQ *1,3,8-trihydroxy-2-metoxy-9,10-anthraquinone* berhasil diekstraksi dari ekstrak etil asetat kulit tanaman kina, sehingga Ekstrak Ea daun selada dilanjutkan sebagai sampel utama mengandung AQ untuk analisis antioksidan.

5.5. Analisis Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etil Asetat (Ea)

Anthraquinone (AQ) termasuk kedalam golongan glikosida, meskipun bukan senyawa fenolik ataupun flavonol menurut Zengin, *et al* (2016), senyawa ini berpotensi sebagai antioksidan yang baik karena nilai konsentrasi hambatan radikal (IC) kurang dari 50 yaitu dalam klasifikasi antioksidan kuat pada pembacaan *2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazil* (DPPH). Antioksidan merupakan senyawa yang mampu menghambat proses oksidasi suatu substrat. Dalam definisi lain yakni suatu molekul untuk mencegah kerusakan komponen seluler yang timbul sebagai akibat dari reaksi kimia tertentu melibatkan radikal bebas (atom dengan elektron tak berpasangan) (Young dan Woodside, 2001).

5.5.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Perlakuan ini bertujuan untuk memperoleh nilai panjang gelombang maksimum larutan DPPH 50 ppm sebagai rujukan utama analisis antioksidan. Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan dengan cara mengukur serapan 0,2 mL larutan DPPH pada daerah panjang gelombang sinar tampak (*visible*) yaitu 400-800 nm, selisih pengukuran adalah per-17 nm.



Gambar 17. Spektra Panjang gelombang maksimum DPPH

Panjang gelombang maksimum larutan DPPH 50 ppm terdeteksi pada 517 nm dan nilai absorbansinya adalah 0,204. Gyawali dalam penelitian *Anti-inflammatory, Anxiolytic and Antioxidant Property of Lactuca sativa L and Formulation of Microspheres Loaded Sustained Release Anti-inflammatory Gel* (2020), menganalisis aktivitas antioksidan dengan *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil*, hasilnya spesifik terbaca pada panjang gelombang yang sama. Daerah serapan hasil penelitian konsisten dengan karakteristik larutan DPPH yang memiliki absorbansi maksimum pada 515-520 nm berwarna violet gelap dan rentan cahaya.

5.5.2 Analisis Antioksidan Ekstrak Etil Asetat

Analisis antioksidan ekstrak etil asetat (Ea) bertujuan untuk mengetahui nilai IC_{50} dari ekstrak sampel yang memiliki kadar total AQ tertinggi. Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan 4 variasi konsentrasi sampel yaitu; 7; 9; 11; dan 13 ppm, hal tersebut untuk meningkatkan sensitifitas dan ketelitian analisis penentuan IC_{50} . Menurut Santoni dkk (2016), klasifikasi senyawa yang dikatakan sebagai antioksidan adalah sebagai berikut:

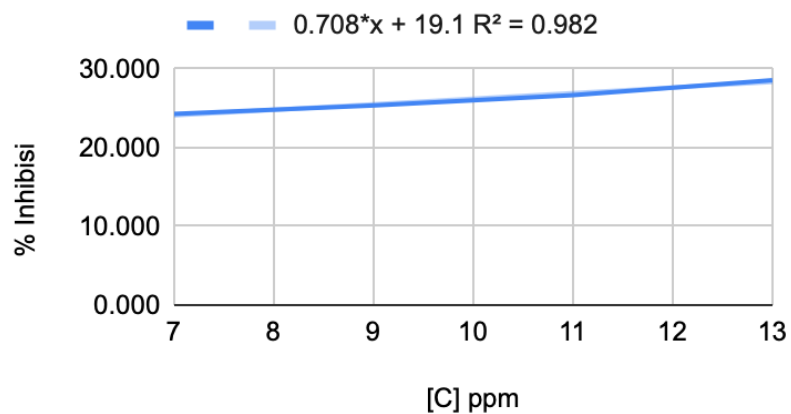
- Sangat kuat apabila nilai $IC_{50} < 50$ ppm
- Kuat apabila nilai IC_{50} berkisar antara 50-100 ppm
- Sedang apabila nilai IC_{50} berkisar antara 101-250 ppm
- Lemah apabila nilai IC_{50} berkisar antara 251-500 ppm
- Tidak aktif apabila nilai IC_{50} lebih dari 500 ppm

Tabel 8. Hasil aktivitas antioksidan DPPH

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi			Σ Absorbansi	% Inhibisi
Blangko	0,280	0,280	0,280	0,280	-
7	0.212	0.212	0.212	0.212	24.286
9	0.209	0.209	0.209	0.209	25.357
11	0.205	0.205	0.206	0.205	26.667
13	0.200	0.200	0.200	0.200	28.571

Hasil absorbansi yang diperoleh dari ekstrak Ea sesuai dengan **Tabel 8**. Mengikuti ketentuan perhitungan % Inhibisi, nilai absorbansi berbanding terbalik dengan hasil % Inhibisi, semakin tinggi konsentrasi, semakin tinggi daya penghambatan radikalnya dan semakin kecil absorbansi yang terbaca pada instrumen UV-VIS.

% Inhibisi vs. [C] ppm



Gambar 18. Spektra % Inhibisi vs Konsentrasi

Diplot grafik kurva kalibrasi dan didapatkan persamaan garis $y = 0,708x + 19,1$ dengan R^2 0,982 untuk penentuan nilai IC_{50} . Nilai linieritas mendekati angka 1 menyatakan korelasi yang tinggi antara analit (x) yaitu variasi konsentrasi sampel yang dibuat terhadap respon instrumentasi (y) sehingga hasil persamaan regresi bisa dijadikan sebagai penentu nilai IC_{50} ekstrak Ea secara akurat. Berdasarkan hasil penelitian, Ekstrak Ea dengan kadar AQ tertinggi memiliki potensi sebagai antioksidan dengan nilai IC_{50} sebesar 43,64 ppm dan termasuk kedalam golongan antioksidan sangat kuat karena kurang dari 50 ppm. Penelitian yang dilakukan Yen, dkk satu dekade lalu dengan metode berbeda menyatakan AQ mempunyai daya pereduksi radikal atas keberadaan gugus hidroksil, senyawa antara berupa *anthrone* memiliki daya antioksidan tinggi dibanding *anthraquinone*.

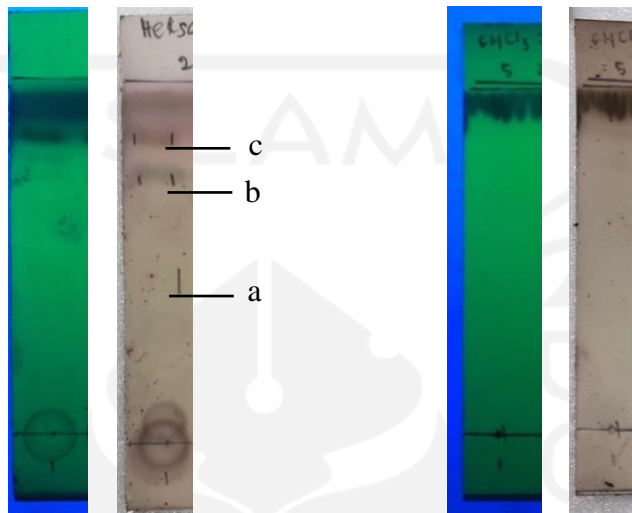
5.6. Isolasi Senyawa Anthraquinone (AQ) dari Ekstrak Etil Asetat (Ea)

Metode isolasi senyawa yang dilakukan dalam penelitian “Karakterisasi Senyawa *Anthraquinone* dari Daun Selada Hijau (*Lactuca sativa* L.) dan Uji Aktivitas Antibakteri” adalah pemisahan Kromatografi, yakni kromatografi kolom basah secara gradien dan kromatografi lapis tipis (KLT). Prinsip metode ini adalah adsorpsi, dimana kumpulan komponen senyawa atau sampel dicampurkan/dialirkan dalam fase gerak (eluen : pelarut) pada silika gel sebagai fase diam. Fase gerak akan membuat sampel terpisah berdasarkan afinitas relatifnya terhadap fase diam yang sangat polar. *Anthraquinone* (AQ) merupakan senyawa polar dan cenderung akan terjerap pada silika gel hanya jika eluen fase gerak berupa perbandingan larutan yang kurang polar.

5.6.1. Optimasi Eluen menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Identifikasi secara kromatografi lapis tipis (KLT) memberi gambaran profil senyawa kimia yang terkandung dalam ekstrak etil asetat (Ea) daun selada hijau. Metode ini dilakukan untuk penentuan pola kromatogram dengan pemisahan optimum serta eluen yang sesuai dalam memisahkan senyawa AQ. Fase diam berupa plat KLT (silika gel GF₂₅₄) ukuran tinggi 7,5 cm; lebar 1 cm; dengan jarak rambat 6 cm.

Digunakan perbandingan eluen (1) n-Heksan : Etil asetat (2:1) dan eluen (2) Diklorometana : Metanol (5:1), *band* atau pita pada plat KLT diidentifikasi menggunakan reagen serum sulfat setelah pembacaan pada lampu UV 254 nm.



Eluen (1) n-Heksan : Ea (2:1) Eluen (2) Diklorometan : MeOH (5:1)

Gambar 19. Kromatogram KLT optimasi eluen

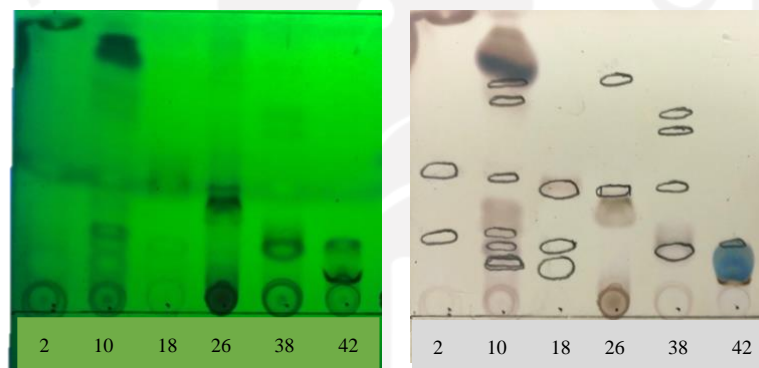
Hasil pola kromatogram KLT eluen (1) menunjukkan senyawa terpisah dengan baik dan terdapat 3 pita utama, diperoleh nilai Rf yakni 0,56 (a); 0,78 (b); dan 0,88 (c). Sebaliknya, tidak ada band/noda serta bercak (spot) terbaca pada kromatogram eluen (2) karena seluruh senyawa telah langsung terelusi sehingga eluen n-Heksan : Ea digunakan terlebih dahulu sebagai fase gerak dengan perbandingan bertahap untuk mengisolasi senyawa AQ dari ekstrak Ea.

5.6.2. Isolasi senyawa menggunakan Kromatografi Kolom

Metode yang digunakan dalam memisahkan senyawa utama yaitu *Anthraquinone* (AQ) adalah kromatografi kolom basah secara gradien dimana fase diam serbuk silika gel dilarutkan dalam eluen (1) n-Heksan : Ea (10:1) hingga menjadi bubuk, kemudian dituang ke dalam kolom secara perlahan. Kolom diketuk-ketuk sampai permukaan silika merata. Kehati-hatian dalam pencampuran juga penuangan bertujuan mencegah timbulnya gelembung udara pada padatan silika dalam kolom

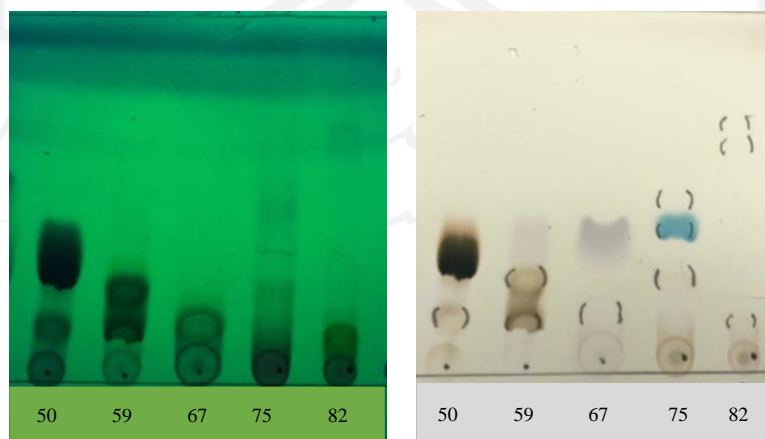
sehingga tidak mempengaruhi proses pemisahan. Perbandingan massa ekstrak dengan silika gel yang digunakan yaitu 1 : 50 guna menghindari media pemisahan yang sempit.

Sebanyak 1,2254 gram ekstrak Ea dihomogenkan menggunakan *celite* sebagai katalis untuk mempermudah dan mempercepat proses pemisahan, ekstrak kemudian dielusi secara gradien menggunakan eluen (1) (10:1) sebanyak 440 mL, (5:1) 480 mL, (2:1) 300 mL serta Ea 300 mL. Variasi perbandingan pelarut dapat mempermudah pemisahan komponen sesuai dengan polaritas senyawanya, diperoleh 104 fraksi hasil. Kromatogram masing-masing jumlah fraksi untuk setiap perbandingan berturut-turut diplot pada plat KLT silika gel GF₂₅₄ dengan selisih 8 fraksi diantaranya dari 42 fraksi (10:1), 40 fraksi (5:1) 8 fraksi (2:1) serta 14 fraksi (Ea).



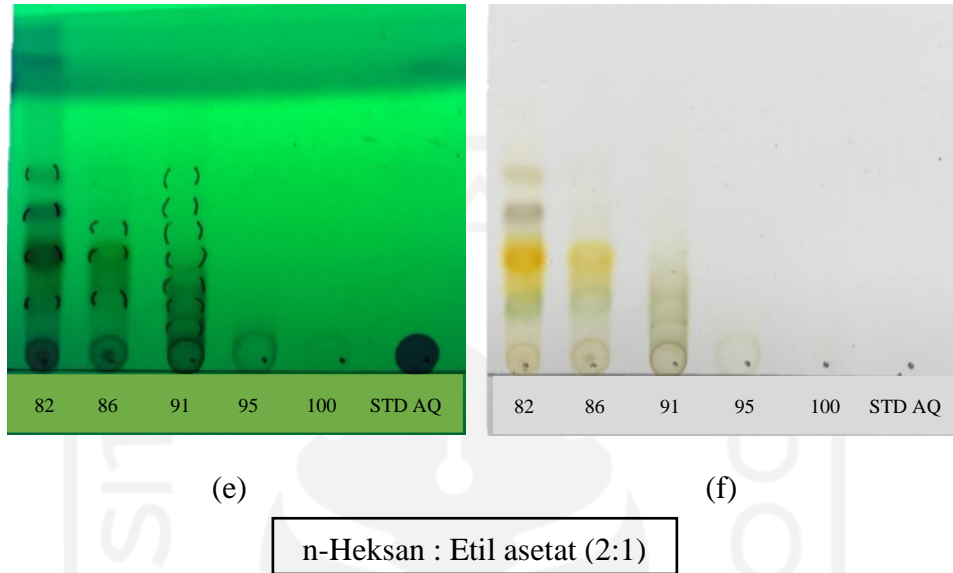
(a) (b)

n-Heksan : Etil asetat (10:1)



(b) (d)

n-Heksan : Etil asetat (5:1)



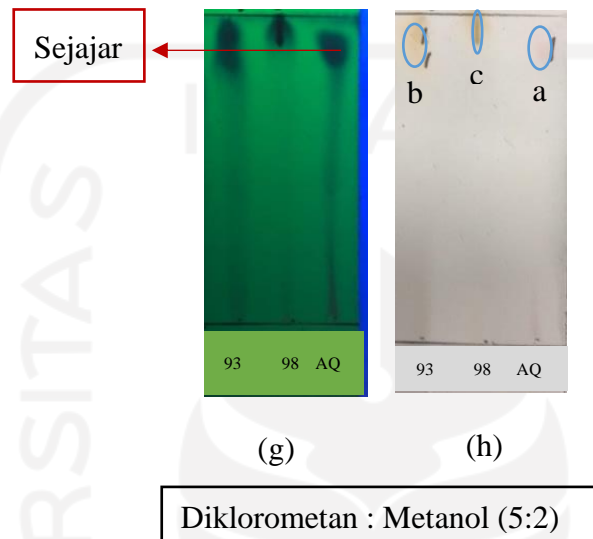
Gambar 20. Kromatogram fraksi kolom

Keterangan,

- (a); (c); (e) = Profil senyawa dibawah lampu UV 254 nm
 (b); (d); (f) = Profil senyawa setelah disemprot serium sulfat dan dipanaskan
 Ukuran plat = (a);(b) tinggi 6,5 cm; lebar 6 cm; dengan jarak rambat 5 cm
 (c);(d) tinggi 6,5 cm; lebar 5 cm; dengan jarak rambat 5 cm
 (e);(f) tinggi 6,5 cm; lebar 6 cm; dengan jarak rambat 5 cm

Hasil KLT menunjukkan bahwa fase gerak eluen (1) (10:1) serta (5:1) membuat senyawa pada fraksi 2 – 42 dan fraksi 50 – 82 terpisah secara sempurna dengan timbulnya noda atau bercak yang tidak menumpuk. Namun, tidak ada indikasi senyawa AQ terdeteksi karena tidak adanya noda berwarna merah yang identik sama seperti standar teknis AQ. Fraksi dengan kromatogram sama kemudian digabung karena dianggap memiliki kandungan senyawa yang sama. Selanjutnya, pada eluen (1) (2:1) fraksi 95 dan fraksi 100 yang mewakili fraksi 91 -104 serta standar teknis AQ tidak

ikut terelusi, terlihat dari tidak munculnya noda yang terpisah dan noda penotolan masih ada pada titik awal elusi sehingga dilakukan pergantian eluen (2) yaitu Diklorometana : Metanol (5:2) yang diurai dengan 2 fraksi penotolan (selisih 5 fraksi).



Gambar 21. Kromatogram senyawa AQ

Keterangan,

- (g) = Profil senyawa dibawah lampu UV 254 nm
- (h) = Profil senyawa setelah disemprot KOH 10%

Ukuran plat = (g);(h) tinggi 8 cm; lebar 3 cm; dengan jarak rambat 6 cm

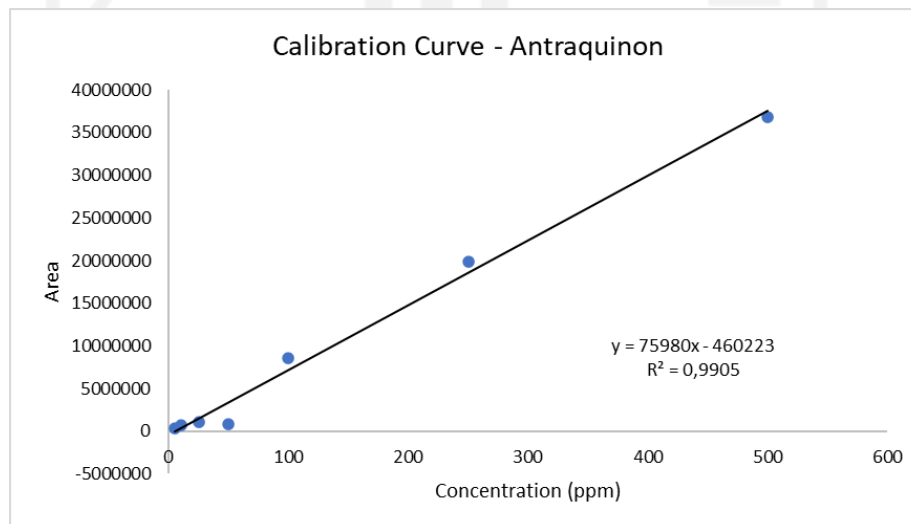
Pola kromatogram hasil elusi eluen (2) (5:2) menunjukkan bahwa fraksi 93 memiliki daerah noda yang sama dengan standar AQ teknis. Diperoleh nilai RF (a) Standar AQ teknis dari noda merah pudar 0,85; fraksi 93 berwarna kuning kecoklatan (b) 0,86; serta fraksi 100 (c) 1. Mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh Yuda dkk, (2017), terdapat 14 noda senyawa AQ pada visual KLT dibawah UV 254 nm dari daun Patikan kebo, 5 noda diantaranya berwarna kuning setelah disemprot KOH 10% dengan rentang RF 0,79 - 0,91. Dalam “Analisis Senyawa Obat” atau antibiotik Rohman (2009), mengungkapkan ketentuan nilai RF yang baik yakni antara 0,2 - 0,8. Selanjutnya fraksi 93 - 97 digabungkan, dibiarkan hingga kering dan disebut sebagai

Isolat Etil Asetat (Ea) yang mengandung turunan *anthraquinone* (AQ). Diperoleh, 68 mg isolat Ea untuk dikarakterisasi menggunakan instrumen KCKT dan FTIR.

5.7. Karakterisasi Senyawa *Anthraquinone* (AQ) Isolat Etil Asetat (Ea)

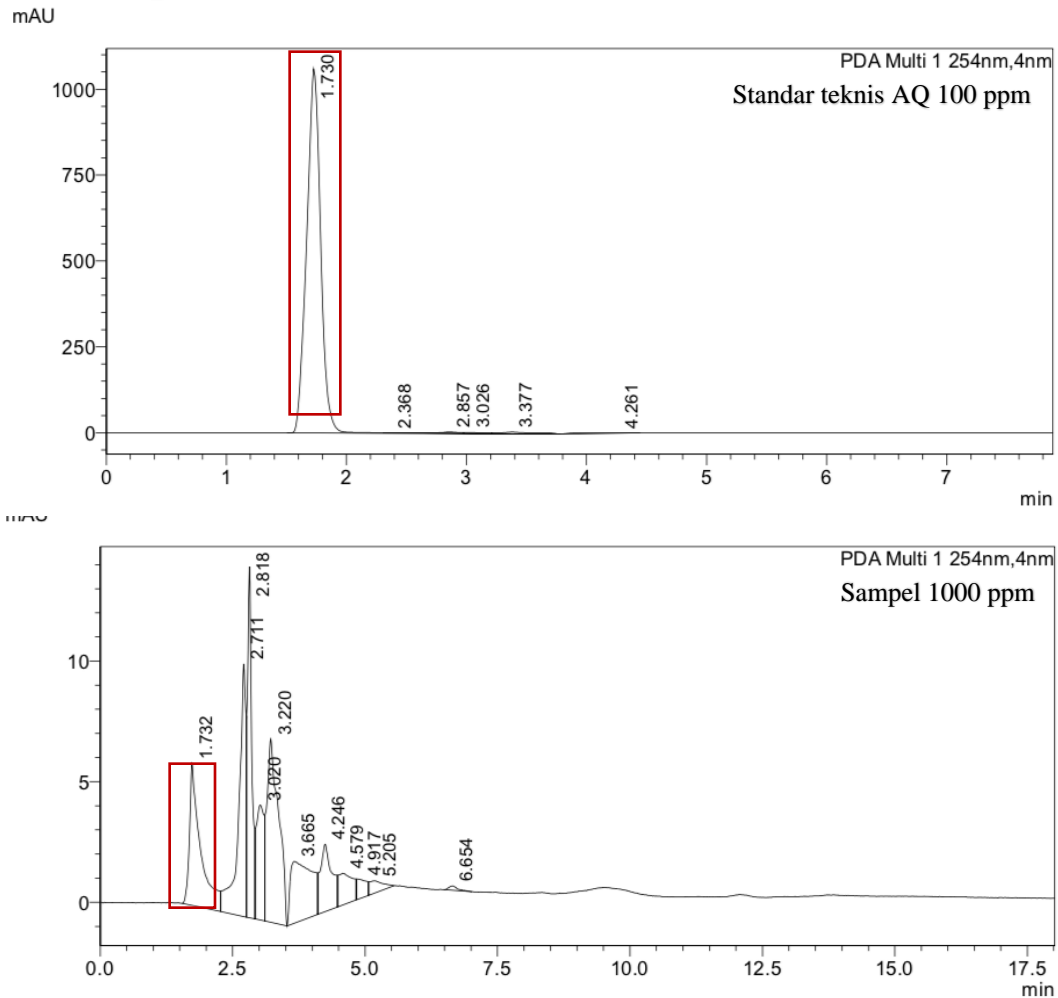
5.7.1. Penentuan kadar *Anthraquinone* (AQ) menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Analisis kuantitatif untuk menentukan kadar AQ menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) dilakukan dengan membuat kurva kalibrasi atas perbandingan antara konsentrasi dengan luas area terbaca detektor UV 254 nm dari 7 variasi konsentrasi standar teknis AQ (Merck 98%) yakni 5; 10; 25; 50; 100; 250; serta 500 ppm. Pada **Gambar 22**. Diperoleh persamaan $y = 75980x - 460223$ dengan $R^2 = 0,9905$. Dua dekade sebelumnya, Mauldin *et al.* (2002) adalah peneliti yang pernah mengidentifikasi kadar pasti senyawa AQ dalam ekstrak *lettuce iceberg* menggunakan HPLC, nilai regresi linier penelitian tersebut mencapai 0,9998. Karena fase terbalik KCKT hasil studi tersebut, senyawa AQ terelusi pada menit ke 6 mengingat ekstrak kasar masih banyak mengandung senyawa polar lain selain AQ sehingga menit 1-5 memungkinkan senyawa fenolik yang lebih polar terpisah lebih dulu.

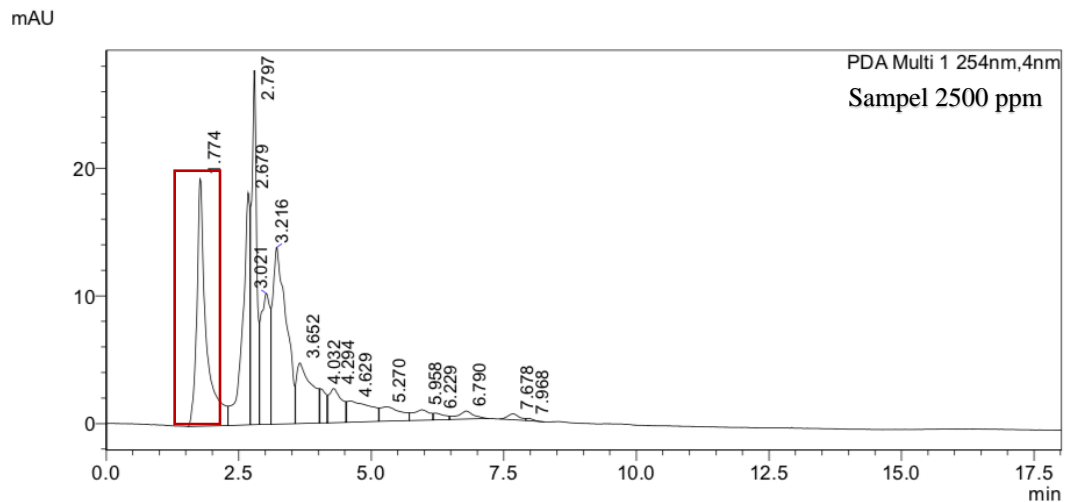


Gambar 22. Kurva kalibrasi *anthraquinone* (AQ)

Isolat Ea dibuat dalam konsentrasi 1000 ppm dan 2500 ppm. Sampel isolat Ea yang telah dipastikan mengandung AQ dilarutkan menggunakan metanol *HPLC-Grade* kemudian dimasukkan kedalam vial dan difilter menggunakan *syringe* agar tidak ada sisa partikel yang dapat membuat kolom tersumbat selama analisis berlangsung. Waktu elusi standar teknis AQ pada seluruh konsentrasi didapatkan pada menit ke 1,657 - 1,869 dengan area terbesar⁴ 36831062. Mengacu pada standar teknis (Merck 98%) yang dianalisis, peak dominan sampel berada pada daerah terbacanya peak standar dimana sampel Isolat Ea konsentrasi 1000 ppm terelusi pada menit ke 1,732 sedangkan untuk konsentrasi 2500 ppm pada menit ke 1,774.



⁴ Hasil KCKT (Data dan Kromatogram) **Lampiran 2.**



Gambar 23. Kromatogram standar teknis AQ dan sampel

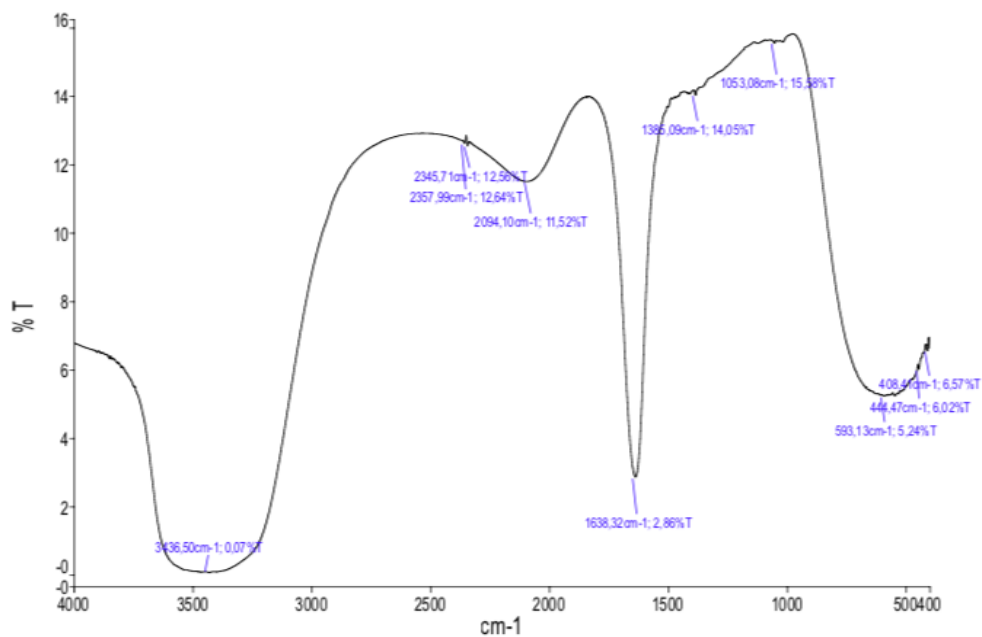
Isolat Ea memungkinkan AQ terpisah lebih dulu atas senyawa lain yang kurang polar mengikuti sistem elusi fase terbalik KCKT. Penentuan kadar senyawa AQ dari isolat daun selada hijau (*Lactuca sativa*) masih sangat jarang dilakukan, penelitian ini mengungkapkan bahwa hasil kadar akhir analisis KCKT senyawa AQ sebesar 7,17 ppm dari isolat Ea 1000 ppm dan 9,18 ppm dari isolat Ea 2500 ppm.

Tabel 9. Hasil Kadar isolat AQ

Sample (ppm)	Area	Conc. (ppm)
1000	84455	7.17
2500	237477	9.18

5.7.2. Analisis Spektrofotometri *Fourier Transform Infra Red* (FTIR)

Analisis struktur menggunakan spektrofotometri FTIR ditentukan berdasarkan pada bilangan gelombang $4000\text{ cm}^{-1} - 450\text{ cm}^{-1}$. Spektra hasil FTIR menggambarkan serapan gugus fungsi dari senyawa AQ yang diidentifikasi.



Gambar 24. Spektra FTIR Isolat Ea

Tabel 10. Interpretasi gugus fungsi senyawa AQ

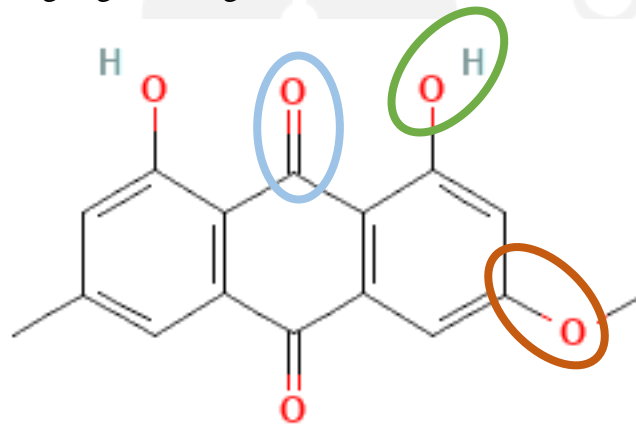
No	Frekuensi hasil (cm ⁻¹)	Rentang Frekuensi (cm ⁻¹)	Tipe Ikatan	Tipe Vibrasi
1.	3436,50	3200-3600 (V)	O-H	Alkohol
3.	1638,32	1630 dan 1700 (V)	C=O	Grup karbonil (Identik <i>quinone</i>)
4.	1385,09	1370-1380 (S)	C-O	<i>Stretching</i> (<i>phycion</i>)

Keterangan :

(V) = Very Strong

(S) = Small

Spektra FTIR Isolat Ea menunjukkan bahwa terdapat gugus OH alkohol yang berada pada bilangan gelombang 3436.5 cm^{-1} , gugus karbonil yang identik dengan *quinone* berada pada panjang gelombang $1638,32\text{ cm}^{-1}$, dan gugus stretching C–O pada panjang gelombang $1385,09\text{ cm}^{-1}$ mengacu Tripathi *et al* (2014) sebagai percabangan metoksi, sehingga kemungkinan struktur senyawa turunan AQ yang teridentifikasi adalah *physcion*. Hasil interpretasi IR sesuai dengan *overview* penelitian dari Muñoz *et al* (2018) dimana spektra IR senyawa AQ memiliki serapan intens antara $1630 - 1700\text{ cm}^{-1}$ sebagai karakteristik dari ion khelat gugus karbonil *quinone*. Serapannya berbeda dengan absorpsi gugus keton, ester, dan asam karboksilat yang terdeteksi pada bilangan gelombang diatas 1700 cm^{-1} .



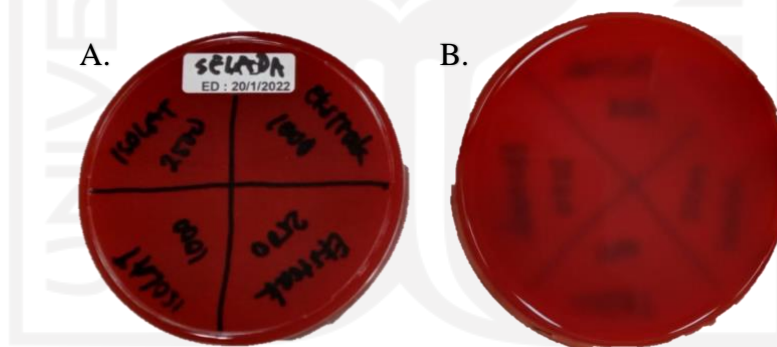
Gambar 25. Interpretasi struktur AQ

5.8. Aktivitas Antibakteri Senyawa *Anthraquinone* (AQ) Daun Selada Hijau (*Lactuca sativa* L.)

Analisis antibakteri dari senyawa *anthraquinone* (AQ) diidentifikasi dari ekstrak dan isolat etil asetat daun selada hijau (*Lactuca sativa* L.) pada 2 konsentrasi yaitu 1000 ppm dan 2500 ppm.

- a. **Uji Sterilisasi Sediaan Stok** dilakukan menggunakan metode agar darah untuk mengetahui apakah terdapat mikroorganisme pada sampel yang digunakan atau tidak (steril tanpa zat kontaminan). Instrumen BD BACTEC 960 beserta medium

MGIT sangat sensitif sebagai media pertumbuhan bakteri lain, sehingga guna menghindari kekeliruan identifikasi bakteri yang digunakan juga mengantisipasi kerusakan alat, maka uji ini dilakukan selama 1 x 24 jam pada suhu optimum pertumbuhan bakteri yaitu 37°C. Media kaya protein dari albumin darah domba dilarutkan dalam nutrient agar (NA – Oxoid) sebagai pemasok nutrisi utama bakteri untuk tumbuh dan berkembang. Diatas media yang telah memadat, masing-masing konsentrasi dioleskan secara zigzag, hal ini dipilih untuk mempermudah identifikasi jika terdapat koloni bakteri sebagai kontaminan. Terlihat pada **Gambar 25**. stok sampel baik ekstrak juga isolat daun selada hijau konsentrasi 1000 ppm dan 2500 ppm yang didapatkan dari seluruh rangkaian metode penelitian adalah tanpa kontaminasi dengan tingkat sterilitas tinggi sebagaimana hasil uji sterilitas sediaan stok. Tidak ada pertumbuhan koloni bakteri apapun pada cawan ditandai dengan jernihnya medium NA - Oxoid.



Gambar 26. Hasil uji sterilisasi stok sampel

Keterangan; (A). Sebelum inkubasi (B) Setelah inkubasi 1 x 24 jam

- b. Suspensi MTB H3Rv.** Medium MGIT 7 mL spesifik untuk instrumen BACTEC 960 dengan kandungan Middlebrook 7H9 *broth*. Proses peremajaan berlangsung selama 5 hari dimana subkultur dilakukan pada hari pertama untuk melihat pertumbuhan bakteri dari stok awal kultur selama 1 x 24 jam, kemudian dihomogenisasi pada hari ke-2. Kecenderungan MGIT *tube* yang kadang memadat

membuat proses pelarutan dilakukan dengan vortex secara terus-menerus. Setelah itu, untuk menghindari kematian dari MTB dan memperbanyak ketersediaan bakteri uji dalam analisis, hari ke-3 pertumbuhan kultur diencerkan dengan menambahkan sodium klorida. Larutan pengencer NaCl berfungsi menjaga keseimbangan ion mikroba dengan memberikan tekanan osmotik tertentu (Setiarsih, 2012). MTB diamati pertumbuhannya hingga hari kelima dan berhasil tumbuh ditandai dengan larutan yang berwarna *orange*. Sebelum digunakan langsung untuk uji kepekaan, kedalam *tube* ditambahkan antibiotik PANTA sebagai sumber nutrisi yaitu campuran dari *lyophilized* senyawa antibiotik diantaranya polimiksin B, amfoterisin B, asam nalidiksik, trimetoprim, serta azlosilin.

c. Suspensi Bakteri Gram Negatif dan Gram Positif.

Satu tube bakteri *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus Aureus*, *Streptococcus pyogenes* disubkultur dalam medium *Nutrient Broth* (NB) (setelah dingin) dimana proses pembuatannya berlangsung steril dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 2 jam. Seluruh bakteri tidak bertahan hidup pada suhu yang lebih rendah ataupun sangat tinggi, sehingga hanya bisa tumbuh optimum pada suhu 37°C ditandai dengan adanya perubahan warna dari jernih larutan menjadi keruh. Keempat bakteri siap digunakan untuk uji kepekaan senyawa *anthraquinone* (AQ) dengan metode difusi cakram.

5.8.1. Uji Kepekaan Senyawa Anthraquinone (AQ) dengan BACTEC 960

Penentuan aktivitas anti-tuberkulosis dari senyawa anthraquinone (AQ) dilakukan terhadap bakteri *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv. Teknik pemeriksaan biakan didasarkan pada metode radiometrik instrumen BACTEC 960. Bakteri ini memetabolisme asam lemak dan menghasilkan CO₂ yang kemudian dideteksi growth indeksnya (WHO, 2018).

Tabel 11. Data OAT Scanning BACTEC 960⁵

Nama OAT	Growt Unit (GU) ($\mu\text{m/mL}$)	Keterangan
Growt Control (GC)	400	Tumbuh optimum
Isoniazid 0,1 ppm	0	Sensitif
Isoniazid 0,4 ppm	0	Sensitif
<i>Rifampicin</i>	400	Resisten
<i>Streptomycin</i>	400	Resisten
<i>Moxifloxacin</i>	0	Sensitif
<i>Levofloxacin</i>	0	Sensitif

Dalam penelitian ini, analisis antibakteri menggunakan metode BD BACTEC 960 diawali dengan identifikasi OAT lini pertama diantaranya isoniazid 0,1 ppm dan 0,4 ppm, *rifampicin*, dan *streptomycin*, serta OAT lini ketiga yaitu *moxifloxacin* dan *levofloxacin*. Tujuan dilakukannya identifikasi adalah mengetahui daya penghambatan OAT paten sebagai standar utama uji antibakteri sampel atau kontrol positif dari bakteri *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) strain H37Rv. Keadaan resistensi ditentukan jika bakteri memiliki jumlah GU tinggi dan lebih dari 100 $\mu\text{m/mL}$, setelah inkubasi selama 11 hari, 11 jam GC percobaan optimum pada nilai 400 $\mu\text{m/mL}$ menandakan medium MGIT dan supplement PANTA bertindak sebagai pemasok nutrisi ekstra untuk pertumbuhan MTB strain H37Rv. OAT *Rifampicin* dan *Streptomycin* belum sensitif membunuh bakteri karena indeks pertumbuhan bakteri yang terdeteksi nilainya sama dengan GC.

⁵ Data OAT BACTEC 960 **Lampiran 5.**

Selanjutnya, uji senyawa AQ. Analisis dilakukan dengan 2 kali pengulangan (duplo) menggunakan 10 tabung MGIT 7 ml untuk ekstrak juga isolat konsentrasi 1000 ppm dan 2500 ppm serta *growth control* (GC). Sebelum itu, 0,1 mL MTB dilarutkan dalam 10 mL NaCl steril (1:100), bila sebelum proses inokulasi tidak ditambahkan NaCl atau dengan penambahan NaCl yang terlalu berlebihan, pertumbuhan bakteri bisa berkurang ataupun terhenti (Pratiwi, 2008). Dalam menyusun tabung MGIT kedalam instrumen BACTEC 960, posisi tabung harus sesuai dengan kode yang tertera pada alat dan *software* agar tidak ada kekeliruan urutan pembacaan sampel. Sampel dan GC yang telah berada pada posisi sesuai di inkubasi selama 12-14 hari, dalam percobaan ini sinyal merah positif dari BACTEC 960 terdeteksi pada waktu (*Time Incubation Period*) 10 hari 22 jam (1) dan 9 hari 22 jam (2) (duplo).

Tabel 12. Hasil uji senyawa AQ sebagai Anti-TB⁶

Nama OAT	Growt Unit (GU) ($\mu\text{m/mL}$)	Keterangan
Growt Control (GC)	400	Tumbuh optimum
Isolat 1000 ppm	400	Resisten
Isolat 2500 ppm	400	Resisten
Ekstrak 1000 ppm	400	Resisten
Isolat 2500 ppm	400	Resisten

Pada uji kepekaan senyawa *anthraquinone* (AQ) menggunakan BD BACTEC 960 dari isolat Ea dan ekstrak daun selada hijau (*Lactuca sativa* L.) menghasilkan nilai GU yang sama dengan GC yaitu 400 $\mu\text{m/mL}$, hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi

⁶ Hasil uji senyawa AQ sebagai Anti-TB **Lampiran 6.**

AQ yang dianalisis belum mencapai nilai konsentrasi hambat minimum senyawa antibakteri karena belum adanya tingkat penghambatan optimum seperti pada standar paten OAT Isoniazid 0,1 dan 0,4 ppm; *Moxifloxacin* serta *Levofloxacin*. Rukminiati (2012), menyatakan isolat dikatakan resisten saat nilai GU 400 $\mu\text{m/mL}$.

5.8.2. Uji Kepekaan Senyawa *Anthraquinone* (AQ) dengan Metode Difusi

Cakram

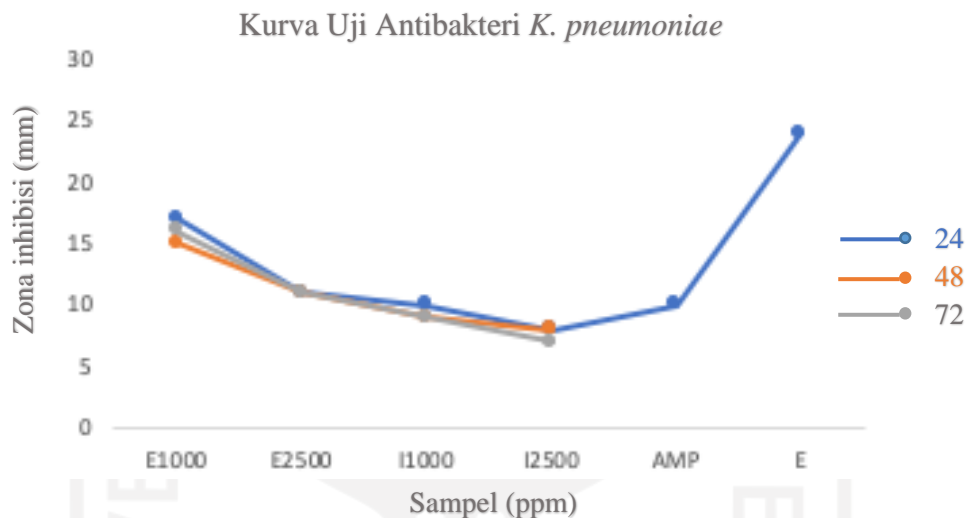
Sifat antibakteri dari senyawa *anthraquinone* (AQ) ekstrak dan isolat daun selada hijau terbukti aktif menghambat pertumbuhan seluruh bakteri uji pada visualisasi zona inhibisi (zona bening) metode difusi cakram (*paper disc*). Mengacu pada penelitian yang dilakukan Hussein *et al*, (2020) keberadaan gugus karbonil dari *quinone* yaitu ikatan karbon dengan atom oksigen yang membentuk elektronik rangkap bereaksi dengan DNA bakteri inang, sehingga menyebabkan penghambatan kerja protein dan mengurangi daya pertumbuhan. Rahim dan Mourisa (2020) mengkonfirmasi bahwa kerusakan polipeptida dinding sel karena adanya AQ menimbulkan peningkatan permeabilitas sel yang akhirnya menghambat pertumbuhan sel dan terjadi kematian sel.

5.8.2.1 Uji Kepekaan Terhadap Bakteri Penyebab Pneumonia

Klebsiella pneumoniae merupakan bakteri penyebab infeksi pneumonia. Adanya protein pada pili yang akan berikatan dengan reseptor permukaan sel (protein adhesin) dan molekul gula membran sel (protein hemaglutinin) menjadi faktor virulensi atau faktor yang sangat berpengaruh terhadap kemampuan *K. pneumoniae* untuk masuk dan bertahan dalam tubuh manusia (Dita *et al* 2019). Senyawa Anthraquinone (AQ) diidentifikasi aktivitas penghambatannya terhadap *Klebsiella pneumoniae* dengan masa inkubasi 24; 48; dan 72 jam dengan *ampicillin* (AMP) dan *erytromicin* (E) sebagai antibiotik kontrol positif .

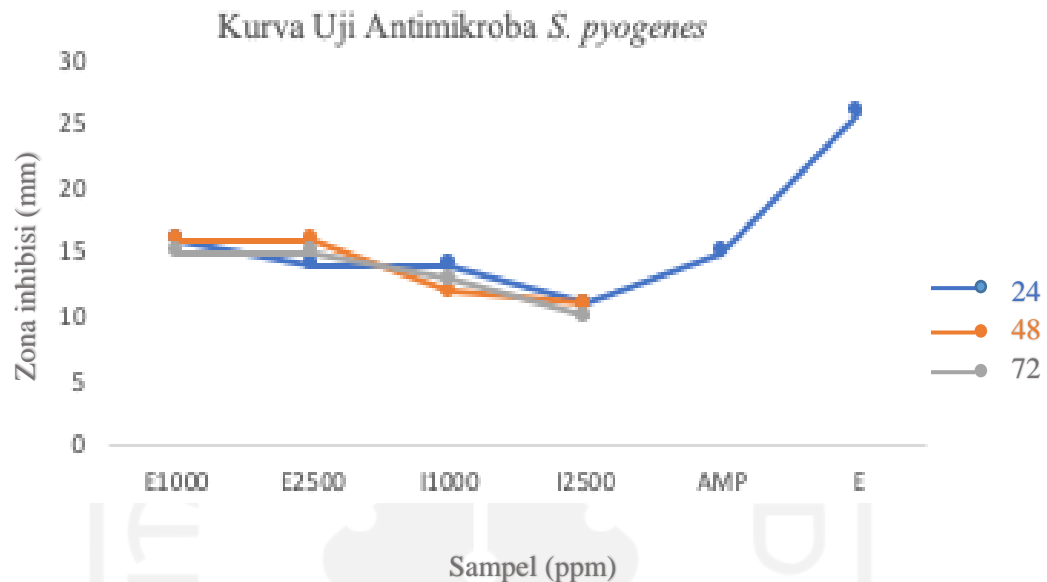
Berdasarkan **Gambar 27**. selama waktu pengamatan, senyawa AQ dari ekstrak 1000 ppm dan 2500 ppm memiliki aktivitas penghambatan bakteri yang tinggi melebihi antibiotik AMP tetapi tidak mencapai klasifikasi E. Dibandingkan dengan isolat, hanya

konsentrasi I1000 yang menghasilkan nilai zona inhibisi sama dengan AMP saat inkubasi 24 jam. Setelah inkubasi 48 dan 72 jam bakteri gram negatif ini cenderung resisten terhadap senyawa sehingga nilai zona inhibisi menurun. Menurut Herawati (2014) lapisan lipopolisakarida dibagian terluar sel bakteri membuat bakteri gram negatif lebih mudah mengalami resistensi. MIC teridentifikasi pada E1000 dan I1000.



Gambar 27. Kurva uji antibakteri *K. pneumoniae*

Bakteri nosokomial yang juga rentan menyebabkan pneumonia yakni *Streptococcus pyogenes*. Dalam penelitian ini, kurva uji antibakteri senyawa AQ terhadap *Streptococcus pyogenes* (**Gambar 28**) menunjukkan aktivitas dua konsentrasi ekstrak memiliki nilai penghambatan yang lebih tinggi dibandingkan dengan antibiotik AMP. I1000 dan I2500 hampir mencapai zona penghambatan antibiotik dengan nilai zona inhibisi berturut-turut 14 mm dan 11 mm. Menurut studi yang dilakukan oleh Savitri, *et al* (2019), pada bakteri gram positif difusi senyawa antibiotik yang dalam hal ini adalah AQ sulit menembus dinding sel bakteri dengan 30-60% lipopolisakarida dibandingkan dengan bakteri gram negatif. Hal tersebut mampu membuat nilai zona bening yang dihasilkan bervariasi (naik turun) selama 72 jam masa inkubasi.



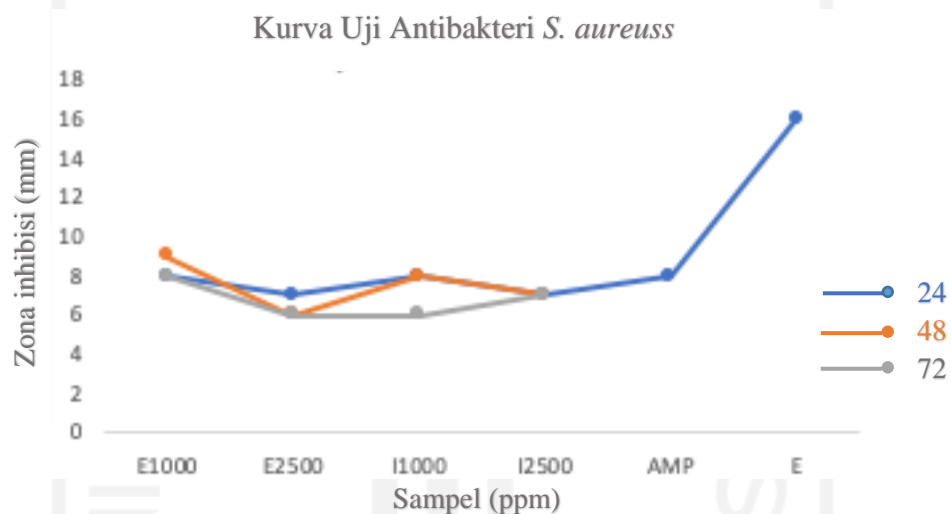
Gambar 28. Kurva uji antibakteri *S. pyogenes*

Nazri dkk (2011), menyatakan aktivitas antibakteri ekstrak metanol daun selada hijau berhasil memiliki zona penghambatan terhadap *K. pneumoniae* dan *S. pyogenes* dengan nilai 12 mm, dibandingkan dengan hasil penelitian ini ekstrak dan isolat Etil asetat berhasil memiliki zona inhibisi lebih tinggi yaitu 17 mm untuk *K. pneumoniae* dari I1000 dan 14-16 mm pada *S. pyogenes* dari E1000; E2500; I1000.

5.8.2.2 Uji Kepekaan terhadap Bakteri Penyebab Infeksi Aliran Darah

Infeksi karena bakteri yang menimbulkan demam dapat mempengaruhi hampir semua sistem organ dalam tubuh, yaitu sistem saraf pusat, sistem pernafasan, sistem pencernaan, sistem urogenital dan sistem peredaran darah (jantung juga paru-paru). Tubuh manusia akan sangat berbahaya jika kondisi yang disebut dengan sepsis terjadi ketika bakteri memasuki aliran darah. Penyakit ini disebut juga dengan bakteremia. Dua jenis bakteri berbeda yaitu *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* adalah penyebab terbanyak kasus infeksi aliran darah. Menurut penelitian Amelia dan Burhanuddin (2018), bakteri *S. aureus* sangat beresiko ditularkan dari fasilitas rumah sakit. Tidak hanya itu, *E. coli* termasuk bakteri umum yang hidup diberbagai media termasuk makanan (Prasetya, 2019).

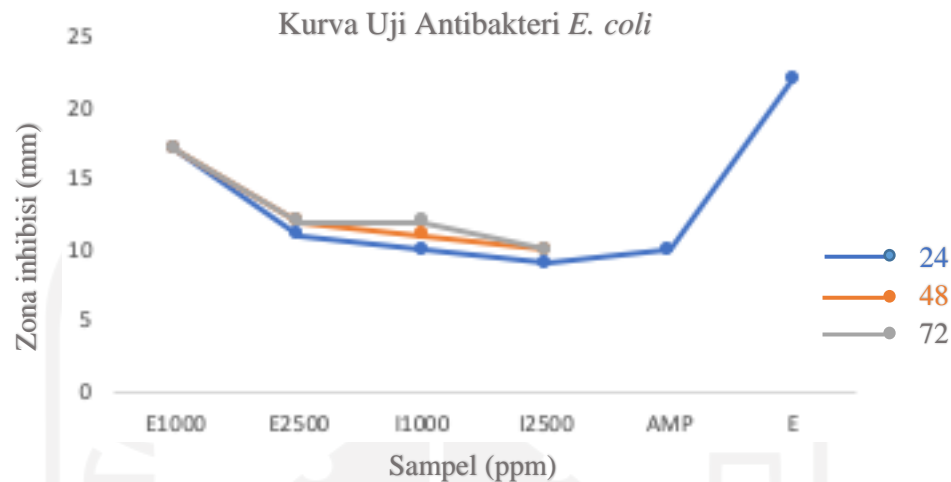
Hasil uji aktivitas antibakteri senyawa AQ terhadap bakteri *S. aureus* terlihat pada **Gambar 29**. ekstrak dan isolat konsentrasi 1000 ppm memiliki visualisasi penghambatan yang terus meningkat selama 72 jam. Menurut Wei *et al* (2014) AQ mulai menghambat bakteri ini sejak 7 jam masa inkubasi. Konsentrasi 1000 ppm merupakan nilai MIC karena pada konsentrasi 2500 ppm keduanya mengalami penurunan zona penghambatan yaitu kurang dari 8 mm dan aktivitasnya tidak dapat diklasifikasikan seperti antibiotik AMP maupun E.



Gambar 29. Kurva uji antibakteri *S. aureus*

Untuk hasil uji aktivitas antibakteri senyawa AQ terhadap bakteri *E. coli* terlihat seluruh ekstrak dan isolat baik konsentrasi 1000 ppm juga 2500 ppm menunjukkan zona inhibisi tinggi melewati antibiotik AMP namun tidak mencapai klasifikasi antibiotik E yakni berkisar 10-17 mm. Nilai ini lebih optimum dibandingkan dengan ekstrak etanol dengan kandungan AQ dari penelitian Rahim dan Mourisa yang memiliki zona inhibisi hanya 16,08 mm. Diameter zona beningnya mengalami peningkatan dari waktu ke waktu selama 72 jam. Penelitian Al-khajrazi dan Rasheed (2019) mendukung hasil terkait bahwa aktivitas penghambatan ekstrak daun selada mulai teridentifikasi dari zona inhibisi sebesar 14 mm.

1



Gambar 30. Kurva uji antibakteri *E. coli*

Kedua bakteri famili *enterobacteria* tersebut memproduksi enzim ESBL atau *extended spectrum beta-lactamases* yang mampu mengurangi kerja antibiotik seperti AMP (Sheu *et al* 2019). Protein hibrida ini berasal dari rekombinasi homolog antar spesies, sehingga membuatnya sedikit rentan juga resisten terhadap antibiotik β -laktam dan monobactam. Tidak termasuk golongan *beta-laktam* antibiotik, senyawa AQ dari daun selada hijau bertindak aktif menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* dan *E. coli*. Prasetya, dalam penelitian yang dilakukan pada tahun 2019 menyatakan efektivitas senyawa dipengaruhi membran luar bakteri. Membran *S. aureus* sebagai bakteri Gram positif memainkan peranan penting sebagai penghalang/*barrier* terhadap berdifusinya senyawa hidrofilik AQ dan interaksi dengan lingkungan luar bakteri. Pada bakteri Gram negatif yakni *E. coli* senyawa AQ dapat dengan mudah mencapai membran sitoplasmik, dibantu oleh protein channel yang terdapat pada membran luar bakteri yaitu porins. Pengujian aktivitas senyawa AQ dengan menggunakan metode difusi cakram pada bakteri Gram negatif dan bakteri Gram positif sebagai agen penyebab penyakit pneumonia juga infeksi aliran darah memperlihatkan hasil yang efektif dalam menghambat laju pertumbuhan bakteri.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa:

1. Senyawa *anthraquinone* (AQ) dari daun selada hijau (*Lactuca sativa* L.) dapat di isolasi menggunakan metode kromatografi; yaitu kromatografi kolom, kromatografi lapis tipis (KLT) serta kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Diperoleh hasil AQ Isolat Ea sebesar 7,17 ppm pada konsentrasi isolat 1000 ppm, serta 9,18 ppm AQ pada konsentrasi isolat 2500 ppm.
2. Hasil karakterisasi senyawa turunan *anthraquinone* (AQ),
 - Instrumen UV-VIS terdeteksi serapan pada ikatan rangkap terkonjugasi dengan karakteristik keberadaan gugus kromofor
 - FTIR, terkonfirmasi gugus fungsi -OH pada $3436,50\text{ cm}^{-1}$, C=C aromatik pada $2357,10\text{ cm}^{-1}$, C=O di $1668,31\text{ cm}^{-1}$ dan C-O ester di $1385,09\text{ cm}^{-1}$ sebagai indikasi senyawa turunan AQ yaitu *physcion*.
3. Senyawa AQ bersifat antibakteri dengan nilai MIC 1000 ppm terhadap bakteri *K. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. aureus* serta *E. coli* namun bukan termasuk dalam klasifikasi senyawa anti-tuberkulosis karena belum mencapai konsentrasi minimum penghambatan bakteri MTB H37Rv.

6.1. Saran

Langkah lanjutan dari penelitian ini adalah perlu dilakukannya karakterisasi spesifik setelah mengkonfirmasi keberadaan *anthraquinone* (AQ) daun selada hijau (*Lactuca sativa* L.). Prosedur terkini seperti KCKT kuantitatif dan analisis NMR dapat menunjang konfirmasi struktur turunan senyawa AQ. Disamping itu, variasi metode *Microscopic Observation Drug Susceptibility* (MODS) dapat memberikan data identifikasi aktivitas anti-tuberkulosis dari senyawa AQ dengan konsentrasi lebih tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

- Agoes, G. (2007). *Teknologi Bahan Alam*. Bandung: ITB Press
- Amelia, R., dan Burhanuddin, N. (2018). Identifikasi Bakteri *Staphylococcus aureus* dengan Infeksi Nosokomial pada Sprei di Ruang Perawatan Pascabedah RSUD Labuang Baji Kota Makassar. *Sinergitas Multidisiplin IPT*, (1), 272 – 278.
- Arvand, M., *et al.* (2000) Antimicrobial resistance in *Streptococcus pyogenes* isolates in Berlin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 46 (4): 621.
- Al-khajrazi, S.M., dan Rasheed, E.M., (2019). Investigation of Antimicrobial Activities of *Lactuca Sativa* (L.) Extracts against Clinical Pathogens. *Al-Nisour Journal for Medical Science*. 1 (2), 302-310.
- Angelika., Schuster., dan Rainer. (2001). *HPLC for Food Analysis*. Germany: Agilent Technologies
- Antolovich, M., Prenzler, P.D., dan Patsalides, E. (2002). Methods for Testing Antioxidant Activity. *Analyst*, 127, 183-198.
- Asensio, G.J., Aguilo, N., dan Marinova, D. (2017). Breaking Transmission with Vaccines: The Case of Tuberculosis. *Microbiology Spectrum*, 1-17.
- Balachandran, C., *et al.* (2016). Isolation and Characterization of 2-hydroxy-9,10-anthraquinone from *Streptomyces olivochromogenes* (ERINLG-261) with Antimicrobial and Antiproliferative Properties. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 218 : 1-11.
- Bartnik, M., dan Facey, P. C. (2017). Plant Containing Anthraquinone Glucoside. *Pharmacognosy*, 101-161.
- Behera, S., Ghanti, S., dan Ahmad, F. (2012). UV-Visible Spectrophotometric Method Development and Validation of Assay of Paracetamol Tablet Formulation. *Journal Analytical and Bioanalytical Techniques*. 3(6):1-6.
- Bijawati, E., Amansyah, M., dan Nurbiah. (2018). Faktor Risiko Pengobatan Pasien Multidrug *Resistance Tuberculosis* (MDR-TB) di RSUD Labuang Baji Kota Makassar tahun 2017. *JNIK*. 1 : 1-17.
- Bone, K., dan Mills, S. (2013). *Principles and Practice of Phytotherapy – Modern Herbal medicine*. United Kingdom: Elsevier Inc.
- Bushong, S.C. (1996). *Magnetic Resonance Imaging. Second Edition*. United States: Moshby Year Book. Inc.

- Byod, R.F. (1995). *Basic Medical Microbiology Five edition*. Little Brown Company Inc: Boston.
- Cazes, J. (1997). *Analytical Instrumentation Handbook, 2nd Edition*. New York: Marcel Dekker – CRC Press.
- Chairul. (2003). Identifikasi Secara Epat Bahan Bioaktif Pada Tumbuhan di Lapangan. *Berita Biologi*, Vol 6 (4), 621-630.
- Christian, G. D. (1994). *Analytical Chemistry. Fifth Edition*. University of Washington. USA: John Wiley & Sons.
- Dachriyanus. (2004). *Analisis Struktur Senyawa Organik Secara Spektroskopi*. Padang: Lembaga pengembangan Teknologi Informasi dan Komunikasi (LPTIK) Universitas Andalas.
- Dita, R.F., *et al.* (2019). The Role of Pili Protein 38,6 kDa *Klebsiella pneumoniae* as a Hemagglutinin and Adhesin Protein Which Serves as Virulences Factor. *Journal of Agromedicine and Medical Science*, 5 (2), 69 – 76.
- Edziri, H.L. *et al.* (2011). Antioxidant, Antibacterial and Antiviral Effect of *Lactuca sativa* Extract. *Ind. Crops. Prod.*, Vol 34 (1), 1182-1185
- Elsa. (2017, Januari 20). *Jenis-jenis HPLC dan Aplikasinya dalam Analisis*. Diakses dari <https://news.labsatu.com/jenis-jenis-hplc-dan-aplikasinya-dalam-analisis/>
- Evans, W.C., dan Evans, D. (2009). Phenols and Phenolic Glycoside. *Trease and Evans' Pharmacognosy*. New York: Saunders Elsevier
- Fair, R.J., dan Tor, Y. (2014). Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21th Century. *Perspective in Medicinal Chemistry*. 4 (6), 25-64
- Fatimah., dan Syamsul. (2008). *Kinerja Spektrofotometer UV-Visible menggunakan Metode Quality Control Chart*. PTBN-BATAN.
- Fessenden, R.J., dan Fessenden, J.S. (1986). *Kimia Organik*. Jilid 1 Edisi ke III. Jakarta: Erlangga
- Firdausya, N., Sianipar, O., dan El Khair, R., (2019). Evaluasi Peresepan Antimikrobia dalam Terapi Empirik dan Definitif pada Infeksi Aliran Darah Karena *Staphylococcus Aureus*. [Skripsi]. Yogyakarta; Universitas Gadjah Mada.
- Fitriyanawati. (2017). Identifikasi Golongan Senyawa Antrakininon (Ekstrak *Rheum officinale* L.). [Skripsi]. Malang: Universitas Muhammadiyah Malang.
- Fouillaud, M., *et al.* (2018). *Anthraquinone*. United States: Chemical Rubber Company Press

- GE Healthcare Life Science. (2012). *Spectrophotometry Handbook*. United Kingdom: General Electric Company.
- Gera, K., McIver, K. S. (2013). Laboratory growth and maintenance of streptococcus pyogenes (The Group A Streptococcus, GAS). *Current Protocols in Microbiology*. 30 (1). 1 – 14.
- Gnanamani, A., Hariharan, P., dan Satyaseela, M.P. (2016). *Staphylococcus aureus: Overview of Bacteriology Clinical Diseases, Epidemiology, Antibiotic Resistance and Therapeutic Approach Chapter 1. Frontiers in Staphylococcus aureus*, 4 –28
- Gyawali, R., et al. (2020). Anti-inflammatory, Anxiolytic and Antioxidant Property of *Lactuca sativa* L and Formulation of Microspheres Loaded Sustained Release Anti-inflammatory Gel. *Journal of Nepal Chemical Society*. 41 (1), 8-15.
- Habibi, A., Fathia, S., Utami, C.T., (2019). Perubahan Karakteristik Bahan Pangan pada Keripik Buah dengan Metode Freeze Drying (Review). *Jurnal Sains Terapan*, 5 (2), 67-76.
- Harvey, D. (2000). *Modern Analytical Chemistry*, United States: The McGraw-Hill Companies, Inc.
- Hendayana, S. (2006). *Kimia Pemisahan Metode Kromatografi dan Elektroforesis Modern*. Bandung: Remaja Rosdakarya Offset.
- Healthwise. (2021). *Tuberculosis; Topic Overview*. St. Boise: St Luke's System.
- Herawati, F. (2014). Terapi Antibiotik pada Infeksi Nosokomial. *Buletin Rasional*, 9 (2), 15-16.
- Hupp, J.A., Kallstrom, G., dan Myers, J.P. (2018). Bacteremic Streptococcus Pyogenes Pneumonia in Adults in the 21st Century. Report of 9 Cases at a Large Community Teaching Hospital and Review of the Literature. *Journal of Respiratory Medicine and Lung Disease*. 3 (1) ; 1035.
- Hussein, M.A., Smesam, H., Al-Iessa, L.A.R., Arjmand, S. (2020). Biological Activity of Anthraquinone Compounds of the Alcoholic Extract Propolis. *Preprint Portico*, (1) , 1 – 6.
- Indahwati., Parwati, I., dan Soeroto, A.Y. (2007). Perbandingan Angka Positivitas dan Waktu Deteksi Pertumbuhan *Mycobacteria Tuberculosis* antara Media Biakan Cair Kolorometrik dan Media Padat Ogawa pada Spesimen Sputum, Cairan Pleura, dan Cairan Serebrospinal. *Jurnal Fakultas Kedokteran*, Vol 41 (2), 1-7.

- Insanu, M., *et al.* (2019). Natural Anthraquinone from The Bark of *Cinchona officinalis* L. *Rasayan Journal of Chemistry*, 12 (2), 519–522.
- Insanu, M., Kusmardiyani, S., dan Hartati, R. (2014). Recent Studies on Phytochemicals and Pharmacological Effect of *Eleutherine Americana* Merr. *Procedia Chemistry*, 12, 221 – 228.
- Irianti, T., Kuswandi., dan Yasin, N. M. (2016). *Anti-Tuberkulosis*. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada.
- Jayanti, A.A.A., Tarini, N.M.A., dan Praharsini, I.G.A.G. (2020). *Staphylococcus aureus* sebagai Agen Penyebab Infeksi pada Kasus Erisipelas Kruris Dekstra dengan Liken Simpleks Kronikus. *Intisari Sains Medis*. 11 (3); 1482 – 1491.
- Julianto, T. S. (2019). *Fitokimia: Tinjauan Metabolit Sekunder dan Skrining Fitokimia*. Yogyakarta: Universitas Islam Indonesia.
- Juniarti, N., Djide, D. M. N., dan Amir, M. N. (2019). Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kelopak Bunga Rosella Terenkapsulasi Maltodekstrin dan Sinergitasnya dengan Isoniazid dan Rifampisin Terhadap *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Jurnal Farmasi Galenika*. Vol 5 (2) 117-123.
- Kazimoto, T., *et al.* (2018). Causative Agents and Antimicrobial Resistance Patterns of Human Skin and Soft Tissue Infections in Bagamoyo Tanzania. *Acta Tropica*. 186: 102 – 106.
- Khopkar, S. M. (2008). *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta: UI-Press.
- Kemenkes RI. (2011). *Pedoman Nasional Pengendalian Tuberkulosis. Edisi ke-2*. Jakarta: Direktorat Jenderal Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan.
- Kemenkes RI. (2012). *Standar Prosedur Operasional Pemeriksaan Mikroskopis TB. Katalog dalam Terbitan Kemenkes RI*. Panduan Bagi Petugas Laboratorium Kemenkes.
- Kemenkes RI. (2018). *Riset Kesehatan Dasar; RISKESDAS*. Jakarta: Balitbang Kemenkes RI.
- Kemenkes. (2020). *TBC Indonesia dalam Gerakan Masyarakat Hidup Sehat*. Jakarta: Direktorat Jenderal Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan
- Kristanti, A. N., Nanik, S. S., dan Mulyadi, T. (2006). *Buku Ajar Fitokimia*. Surabaya : Universitas Airlangga

- Kristianingrum, S., (2016). *Handout Spektroskopi Infra Merah*. Yogyakarta: Universitas Negri Yogyakarta.
- Kristianingrum, S., (2016). *Spektroskopi Ultra Violet dan Sinar Tampak (Spektroskopi UV-VIS)*. Yogyakarta: Universitas Negri Yogyakarta.
- LaCourse, M.E., dan William, R.L. (2017). *General Instrumentation in HPLC*. United States: University of Maryland MD.
- Lewis, R.E. (2011). Current Concept in Antifungal Pharmacology. *Mayo Clin Proc*, 86 (8) ; 805-817.
- Lundanes, E., Reubsaet, L., dan Greibrokk, T. (2014). *Chromatography: Basic Principles, Sample Preparation and Related Methods*. Germany: Wiley-VCH
- Mauldin, R.E., *et al.* (2002) Determination of Anthraquinone in Technical Material, Formulations on Lettuce by High Performance Liquid Chromatography. *J. Agr and Food Chemistry*, 50, 3623 – 3636.
- Mauliku, N.E., Hendro, W., dan Saputro. S. H. (2017). Anti-tubercular Activity of Extract and Compound of Noni (*Morinda citrifolia* Linn). *International J. of Pharmacy and Pharmaceutika Science*, 9 (12), 105-109.
- Marieke, *et al.* (2018). *Handbook on TB laboratory diagnostic methods in the European Union*. Germany: ECDC
- Martin, R.M., dan Bachman, M.A., (2018). Colonization, Infection and The Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8 (4).
- Materska, M., *et al.* (2018). Polyphenolic Profiles in Lettuce (*Lactuca sativa* L.) after CaCl₂ Treatent and Cold Storage. *European Fod Research and Technology*, 245, 733-744.
- Mezzetti, A., dan Leibl, W. (2017). Time-resolved Infrared Spectroscopy in The Study of Photosynthetic Systems. *Photosynthetic Research*, 131 (2), 121-144
- Moon, K.M., *et al.* (2020). Recent Trends in Controlling the Enzymatic Browning of Fruit and Vegetable Products. *Molecules*. 25 (12). 2754
- Moore, D.K., *et al.* (2006). Microscopic Observation Drug Susceptibility Assay for The Diagnosis of TB. *N England Journal Medicine*, 355, 1539-1550.
- Moosavi, S.M., dan Ghassabian, S., (2018). *Linearity of Calibration Curves for Analytical Methods: A Review of Criteria for Assessment of Method Reliability, Calibration and Validation of Analytical Methods - A Sampling of Current Approaches*. Mark T. Stauffer, IntechOpen,

- Molyneux, P. (2004). The Use of The Stable Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Songklanakarin J. of Science and Technology*, Vol 26 (2), 211-219.
- Muhammad, R., Bariun, H., dan Ibrahim, I., (2017). Uji Anti-Tuberkulosis Ekstrak biji Beligo. *Jurnal Farmasi*, Vol 7 (1), 52-57.
- Muhsin, A., dan Shami, M. (2015). Isolation and Identification of Anthraquinones Extracted From *Morinda Citrifolia* L. (Rubiaceae). *Ann Chromatography Separation Tech*, 1 (3), 1012-1014.
- Mukhriani. (2014). Ekstraksi, Pemisahan Senyawa dan Identifikasi Senyawa Aktif. *Jurnal Kesehatan*, Vol 7 (2), 361-367.
- Muñoz, G.D., *et al.* (2018) Anthraquinone : An Overview. *Studies in Natural Products Chemistry*, 58, 319-337.
- Musthapa, I. (2009). *NMR Spectroscopy*. Bandung : Universitas Pendidikan Indonesia
- Nadia, S. (2021). *Kongres Nasional (KONAS) XVI Perhimpunan Dokter Paru Indonesia (PDPI)*.
- Nazri, N. A. A. M., Adnan, A., dan Mohamad, A. (2011). In vitro Antibacterial and Radical Scavenging Activities of Malaysian Table Salad, *Afr J. Biotechnology*, 10 (30), 5728-5735.
- Noumedem, J.A.K. *et al.* (2017). *Lactuca sativa. Medicinal Spices and Vegetable from Africa*, 437-449.
- Noumedem, J.A.K. *et al.* (2013). Antibacterial activities of the methanol extracts of ten Cameroonian vegetables against Gram-negative multidrug-resistant bacteria. *BMC Complement. Altern. Med.* 13 (1), 26
- Nugroho, A. (2017). *Teknologi Bahan Alam*. Banjarmasin: Lambung Mengkurat University Press.
- Oppegaard, O., *et al.* (2020). Emergimh Threat of Antimicrobial Resistance in β -Hemolytic Streptococci. *Front Microbiol*, 11; 797.
- Peraturan (UE) No.1907/2006. Diakses dari Lembar Data Keselamatan Bahan (266)
- Prasetya, Y.A., *et al.* (2019). Deteksi Fenotipik Escherichia coli Penghasil Extended Spectrum Beta-Lactamases (ESBL) pada Sampel Makanan di Krian Sidoarjo. *Life Science*. 8 (1); 75 – 85.
- Pratiwi, S,T. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Universitas Gajah Mada; Yogyakarta, 38,

- Priambodo, Y.B., Irianti, T., dan Pratiwi, S. U. T. (2018). Uji Aktivitas Anti-tuberkulosis Ekstrak Etil Asetat Daun Jati (*Tectona grandis* Linn F.). [*Skripsi*]. Yogyakarta; Universitas Gadjah Mada
- Pramesthi, D.E., Setiawati, Y., dan Koendhori, E.B. (2020). Comparison of Aloe Vera Leaves Ethanol Extract Effect Against *Escherichia coli* ESBL and *Klebsiella pneumoniae* ESBL. *Jurnal Kedokteran Syiah Kuala*, 20 (2)
- Rajin, M. (2019). *Manfaat Lidah Buaya (Aloe vera) sebagai Obat Herbal Pendamping Infeksi Kuman Tuberkulosis*. Jakarta: Cakrawala Indonesia.
- Rahim, D.A., dan Mourisa, C. (2020). Uji Daya Hambat Ekstrak Kulit Lidah Buaya (*Aloe barbadensis* Miller) terhadap Bakteri *Escherichia coli*. *Jurnal Ilmiah Maksitek*, 5 (4), 48-52
- Ramadhan, A., et al. (2021). Anthraquinone Derivatives and Its Antimicrobial Properties from *Paederia foetida* Stems. *The Natural Product Journal*, 11 (2), 193-199.
- Rizalina, H., Cahyono, E., dan Mursiti, S. (2018). Optimasi Penentuan Kadar dalam Darah menggunakan *Gas Chromatography*. *Indonesian Journal Chemical of Science*, 7 (3), 254-261
- Riyanto. (2014). *Validasi dan Verifikasi Sesuai dengan ISO/IEC 17025 Laboratorium Pengujian dan Kalibrasi*. Yogyakarta: Deepublish.
- Rohmah, J., Rini, C.S., dan Wulandari, F.E. (2019). Uji Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Selada Merah (*Lactuca sativa* Var. *Crispa*) pada Berbagai Pelarut Ekstraksi dengan Metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*). *Jurnal Kimia Riset*, Vol 4 (1), 18-32.
- Rohman A. *Kromatografi untuk Analisis Obat*. Yogyakarta: Graha Ilmu; 2009.
- Rostagno, M. A., dan Prado, J. M. (2013). *Natural Product Extraction: Principles and Application*. Cambridge: RSC Publishing.
- Rukminiati, Y. (2012). Uji Kepekaan Obat Anti Tuberkulosis Lini Kedua menggunakan BACTEC *Mycobacterium Growth Indicator Tubes* (MGIT) 960. *Jurnal Kefarmasian Indonesia*. 2 (2). 43-47.
- Safety Data Sheet* (SDS) 8.00465. (2021). Sigma-Aldrich Merckmillipore KGaA. Frankfurt: German.
- Santoni, A., Efdi, M., dan Ismail. (2016). Structure Elucidation of Anthraquinone Derivative from *Cassia Alata* Linn and Antioxidant Activity. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 8 (10), 117-120

- Saparianto, S. (2013). Konsep Praktis *High Performance Liquid Chromatography*. Diakses dari DOI: 10.13.140/RG.2.2.18909.10729
- Sarowska, J., *et al.* (2009). Virulence Factors, Prevalence and Potential Transmission of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: Recent Reports. *Gut Pathogens*, 11:10, 2 – 16.
- Savitri, N.H., Indiasuti, D.N., dan Wahyunitasari, M.R. (2019). Aktivitas Daya Hambat Ekstrak Bawang Putih (*Allium sativum L.*) terhadap Bakteri *Streptococcus pyogenes* dan *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Vocational Health Studies*, 03, 72-77
- Sayyah, M., Hadidi, N., dan Kamalinejad, M., (2004). Analgesic and anti-inflammatory activity of *Lactuca sativa* seed extract in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol 92, 325-329.
- Setiarsih, H.S., *et al.* (2019). Sensitivitas dan Spesifisitas Kultur *Mycobacteria Tuberculosis* Menggunakan Media Cair Pada Sediaan *Bronchoalveolar Lavage* (BAL) dari Pasien Tuberkulosis Paru BTA Negatif . *Jurnal Respirasi Indonesia*. 32 (20), 89-99
- Sheu, C.C., *et al.* (2019). Infection caused by Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*: An Update on Therapeutic Option, *Front Microbiol*, 10:80
- Shoyket, K., Broeckhoven, K., dan Dong, M. W. (2019). Modern HPLC Pumps: Perspectives, Principles, and Practice. *LCGC North America*. Vol 37 (6). 374-384.
- Siagian, A. S., (2018). Respon Pemberian Pupuk Organik Cair Air Cucian Beras Terhadap Pertumbuhan dan Produksi Tanaman Selada Hijau (*Lactuca sativa L.*). [Skripsi]. Medan: Universitas Medan Area.
- Sianipar, O., *et al.* (2017). Phylogenetic Profile of *Escherichia coli* causing Bloodstream Infection and Its Clinical Aspect. *Clinical Pathology and Medical Laboratory*. 24 (1); 29-35.
- Siddiqi, S.H., dan Gerdes, R. (2006). MGIT Procedure Manual (for BACTEC™ MGIT 960™ TB SYSTEM). FIND Diagnostics, Geneva : Switzerland.
- Simpson, D., dan Amos, S. (2017). *Pharmacognosy: Other Plant Metabolites*. United States: Elsevier Inc.
- Sindora, G., Allimudin, A.H., dan Harlia., (2017). Identifikasi Golongan Senyawa Antraquinon pada Fraksi Kloroform Akar Kayu Mengkudu (*Morinda citrifolia, L.*) JKK. Vol 6 (1). 37-41.

- Sitorus, M. (2009). *Spektroskopi Elusidasi Struktur Molekul Organik*. Edisi Pertama. Yogyakarta: Graha Ilmu
- Skoog, D. A., Holler, F. J., and Crouch, S. R., (2007). *Principles of Instrumental Analysis Sixth Edition*. Canada: Thomson Corporation
- Skolnik, R., dan Ambareen A. (2010). Ending The Neglect of Neglected Tropical Disease. Diakses dari <https://assets.prb.org/pdf10/neglectedtropicaldiseases.pdf>
- Sularz, O., Smolén, S., dan Koronowicz, A. (2020). Chemical Composition of Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Biofortified with Iodine by KIO₃, 5-Iodo and 3.5-Diiodosalicylic Acid in a Hydroponic Cultivation. *Agronomy*, Vol 10, 1-17
- Snyder, L.R., Glajch, J.L., dan Kirkland, J.J. (1988). *Practical HPLC Method Development*. New York: John Wiley & Sons.
- Srinivasahan, V., dan Durairaj, B. (2014). Antimicrobial Activity of Hydroethanolic Extract of *Morinda citrifolia* Fruit. *Int. J. of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3 (9), 26-33.
- Tamayo, E., *et al.* (2016). *Streptococcus pyogenes* Pneumonia in Adults: Clinical Presentation and Molecular Characterization of Isolates 2006 – 2015. *PLOS ONE*. 11 (3).
- Tarina, N. T.I., dan Kusuma, S.A.F. (2017). Deteksi Bakteri *Klebsiella pneumoniae*. *Farmaka*. 15 (2): 119 – 126.
- Thermo. (2011). Hypersil – Reproducible and Reliable HPLC Columns. Diakses dari <https://www.hplc.eu/thermo.htm>
- Treyball, R.E. (1980). *Mass-Transfer Operation*. Singapore: McGraw Hill Book Company.
- Tripathi, B., *et al.* (2014). Potential Antioxidant Anthraquinones Isolated from *Rheum emodi* Showing Nematicidal Activity against *Meloidogyne incognita*. *JOC*; 1-9.
- Ubay. (2020 Desember, 11). *Teknik Pemisahan Kromatografi* . Diakses dari <https://adalah.co.id/kromatografi/>
- USDA National Nutrient Data Base for Standart Reference. (2018). *Lettuce Green Leaf. Basic Report*. The National Agrcultural Library
- Utomo, H. (2013). Sintesis, Analisis Kemurnian dan Karakterisasi Senyawa 6,8-Dibromo-kuersetin. [*Skripsi*]. Makassar: Universitas Hasanuddin.
- Warono, D., dan Syamsudin. (2013). Unjuk Kerja Spektrofotometer untuk Analisa Zat Aktif Ketoprofen. *Konversi*, Vol 2 (2), 57-65

- Wati, N. F. N. (2014). Peningkatan Kualitas Minyak Nilam melalui Proses Adsorpsi menggunakan Adsorben γ -Alumina Dengan Sistem Flow. *Indonesian Journal of Chemical Research*, Vol 2 (1), 84-95.
- Wei, Y., *et al.* (2014). Antibacterial Mode of Action 1,8-dihydroxy-anthraquinone from *Porphyra haitanensis* Against *Staphylococcus aureus*. *Natural Product Research*, 29 (10), 976-979.
- Wonohardjo, S., (2013). *Metode-Metode Pemisahan Kimia*. Jakarta: Indeks
- WHO. (2018). *Technical Manual for Drug Susceptibility Testing of Medicines used in Treatment of Tuberculosis*. United States: World Health Organization
- WHO. (2019). *Pneumoniae*. United States: World Health Organization
- WHO. (2020). *Global Tuberculosis Report*. United States: World Health Organization
- WHO. (2021). *Global Tuberculosis Report*. United States: World Health Organization
- WHO. (2021). *World Health Statistics 2021*. United States: World Health Organization
- Xu, F., Zou, G. A. dan Liu, Y. Q. (2012). Chemical Constituents from Seeds of *Lactuca sativa*. *Chemistry of Natural Compound*, Vol 48 (4), 574-576.
- Yanlisastuti., dan Fatimah, S. (2016). Pengaruh Konsentrasi Pelarut untuk Menentukan Kadar Zirkonium dalam Paduan U-Zr Dengan Menggunakan Metode Spektrofotometri Uv-Vis. *Pusat Teknologi Bahan Nuklir*, 17, 22-33.
- Yen, G. C., dan Chen, H. Y. (1995). Antioxidant Activity of Various Tea Extracts in Relation to Their Antimutagenicity. *Journal Agriculture of Food Chemical*, 43, 27-32.
- Yen, G.C., Duh, P.D., Chuang, D.Y. (2010). Antioxidant Activity of Anthraquinones and Anthrone. *Food Chemistry*, 70, 437-441
- Young, I.S., dan Woodside, J.V. (2001). Antioxidant in Health and Disease. *Journal Clinical Pathology*, 54 ; 176 – 186.
- Yuda, P. E. S. K., Cahyaningsih, E., dan Winariyanti, N. L. P. Y. (2017). Skrining Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Ekstrak Tanaman Patikan Kebo (*Euphorbia Hirta* L.). *Jurnal Ilmiah Medicamento*, 3 (2), 61 – 70.
- Zengin, G., *et al.* (2016). Anthraquinone profile, antioxidant and enzyme inhibitory effect of root extracts of eight *Asphodelinetaxa* from Turkey: can *Asphodeline* roots be considered as a new source of natural compounds?. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31 (5), 754-759.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil Determinasi Tanaman



LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA
(INDONESIAN INSTITUTE OF SCIENCES)
PUSAT PENELITIAN KONSERVASI TUMBUHAN DAN KEBUN RAYA
(Research Center For Plant Conservation And Botanic Gardens)
Jalan Ir. H. Juanda No. 13, PO Box 309 Bogor 16003, Indonesia
Telepon +62 251 8322187; +62 251 8322220 Faximili +62 251 8322187

Nomor : B-1202-III/KS.01.03/2/2021 Bogor, 19 Februari 2021
Sifat : -
Lamp. : -
Perihal : Identifikasi tanaman

Yth. Prof. Riyanto, S.Pd., M.Si., Ph.D.
Dekan Fak. Matematika & Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Islam Indonesia
Yogyakarta 55584

Menindak lanjuti surat Saudara Nomor 96/Dek/70-TA/Bag.TA/2/2021 tanggal 12 Februari 2021, dengan ini kami sampaikan hasil identifikasi berupa tanaman; akar, batang dan daun yang dibawa ke Pusat Penelitian Konservasi Tumbuhan dan Kebun Raya – LIPI oleh :

Nama : Eva Fadilah
No. Mhs : 17612095
Prodi : S-1

adalah benar dari jenis *Lactuca sativa* L. (sinonimnya *Lactuca sativa* subsp. *crispa* (L.) Schübl. & G. Martens, suku Asteraceae, selada hijau/selada.

Demikian kami sampaikan dan untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Kepala,

Dr. R. Hendrian, M.Sc.

Lampiran 2. Hasil KCKT



DIREKTORAT PENGELOLAAN LABORATORIUM, FASILITAS RISET, DAN KAWASAN SAINS TEKNOLOGI

Gedung B.J. Habibie Jalan M.H. Thamrin Nomor 8,
Jakarta Pusat 10340
Telepon/WA: 0811 8612 392; E-mail: dit-plfrkst@brin.go.id
www.brin.go.id

I. Identitas Pemohon

Nama : Nova Dilla Yanthi
Alamat : PONDOK BAMBU TOWN HOUSE BLOCK E8 RT/RW 001/007 KEL: PONDOK BAMBU,KEC: DU SAWIT, JAKARTA TIMUR DKI JAKARTA. 13430

II. Detail Pengajuan Layanan

ID Transaksi : #23790
Nama Layanan : Karakterisasi lanjut UFLC SHIMADZU
Deskripsi Pengujian : 1. fraksi anthraquinone mudah teroksidasi, sehingga baik penyimpanan dan penanganannya memerlukan suhu dingin atau menghindari overhear 2. fraksi katekin mudah teroksidasi oleh udara dan penyimpanan dan penanganannya memerlukan suhu dingin atau menghindari overhear
Tanggal Pengajuan : 18-10-2021 13:33:39
Tanggal Pelaksanaan : 15-12-2021 11:39:47 s.d. 15-12-2021 11:40:36
Daftar Sampel :

No	Kode Sampel	Nama Sampel
1	1292-23790-1	fraksi anthraquinone dan fraksi katekin
2	1292-23790-2	fraksi anthraquinone dan fraksi katekin

III. Hasil Pengujian

Keterangan hasil pengujian : Laporan Hasil pengujian telah diverifikasi oleh penyelia. Harap mengisi ulasan agar menu download hasil pengujian dapat muncul.

Dikeluarkan di : Cibinong
Pada Tanggal : 15 Desember 2021

Laporan ini mengacu pada kondisi sampel saat diterima dan hanya berhubungan dengan sampel yang diuji. *This report refers to the condition when samples received and relate onlywith samples tested*

Laporan ini tidak boleh disalin sebagian maupun seluruhnya tanpa seijin dari Direktorat Pengelolaan Laboratorium, Fasilitas Riset, dan Kawasan Sains dan Teknologi BRIN. *This report may not be reproduced in whole or in part without permission from Directorate of Laboratory Management, Research Facilities, and Science and Technology Area*

Disetujui Oleh (Approved by)	
Nama	: Nurbaiti Marsas Prilitasari, S.T.
Jabatan	: Koordinator Pengelola Laboratorium Kawasan Cibinong
Tanggal	: 15 Desember 2021
TTD	:  TT ELEKTRONIK



Dokumen ini ditandatangani secara elektronik menggunakan sertifikat dari BSrE, silahkan lakukan verifikasi pada dokumen elektronik yang dapat diunduh dengan melakukan scan QR Code



**DIREKTORAT PENGELOLAAN LABORATORIUM,
FASILITAS RISET, DAN KAWASAN SAINS TEKNOLOGI**

Gedung B.J. Habibie, Jalan M.H. Thamrin Nomor 8
Jakarta Pusat 10340
Telepon/WA: 0811 8612 392
<https://www.brin.go.id>

No. ID ELSA : **23790**
Transaction Number

Metode : **HPLC**
Method

Nama Laboratorium : Laboratorium IVD (*In Vitro Diagnosis*) dan CD3 - BRIN
Name of Laboratory

Alamat Laboratorium : Komplek LIPI Cibinong (*Cibinong Science Center*), Gedung PPII
Laboratory Address
Jl. Raya Jakarta – Bogor Km 47
Cibinong, Bogor, Jawa Barat - Indonesia 16912
Email : layan@lipi.go.id ; Telp +62 812 8463 6367

Kondisi Pengukuran/Parameter Pengujian *Measurement Conditions/Testing Parameters:*

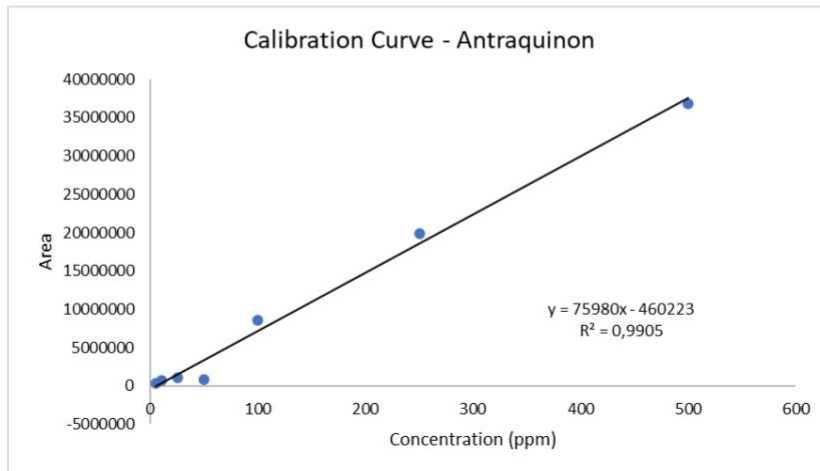
Instrumen: UFLC Prominence LC-20AD, Shimadzu, coupled with SIL-20AHT autosampler, CBM-20A communication bus, CTO-20A oven column, SPD-M20A diode array detector.

- Anthraquinon operation conditions:
- Runtime: 18 min
- Flowrate: 1 mL min⁻¹
- Eluent: 80% methanol: 20% water
- Wavelength: 254 nm
- Injection volume: 10 µL
- Column: ODS Hypersil 250 x 4.6 mm, 5 µm

Hasil Pengujian *Testing Results :*

Kurva kalibrasi larutan standar anthraquinone

Conc. (ppm)	Ret. Time (min)	Area
5	1.657	359045
10	1.670	654232
25	1.684	1030983
50	1.704	864089
100	1.771	8600318
250	1.806	19859718
500	1.869	36831062



Hasil analisa larutan sampel anthraquinone

$$y = 75980x - 460223$$

Sample (ppm)	Area	Conc. (ppm)
1000	84455	7.17
2500	237477	9.18

Catatan Note:

Data hasil pengujian yang autentik adalah data yang berada di Repositori Ilmiah Nasional (RIN) BRIN yang dapat diakses melalui *link url* yang tertera pada hasil pengujian pada lembar ini. *Link url* bersifat unik dan, hanya dibagikan untuk pengguna pada hasil uji transaksi pada Laporan Hasil Uji ini.

Daftar sampel yang dilakukan pengujian terdapat di lembar pengesahan.

Penamaan sampel sesuai dengan penamaan pada saat permohonan pengajuan layanan.

Terima kasih sudah melakukan pengujian/ penyewaan alat/ proses riset dengan fasilitas yang tersedia di Laboratorium IVD (*In Vitro Diagnosis*) dan CD3. Jika dikemudian hari, hasil pengujian atau analisis ini akan dipublikasikan, mohon kiranya bisa menambahkan dalam Ucapan Terima Kasih atau Acknowledgement di dalam publikasi Anda,

seperti dalam contoh format berikut:

Dalam bahasa Indonesia : "Penelitian ini didukung oleh fasilitas riset, dan dukungan ilmiah serta teknis dari Laboratorium IVD (*In Vitro Diagnosis*) dan CD3 di Badan Riset dan Inovasi Nasional".

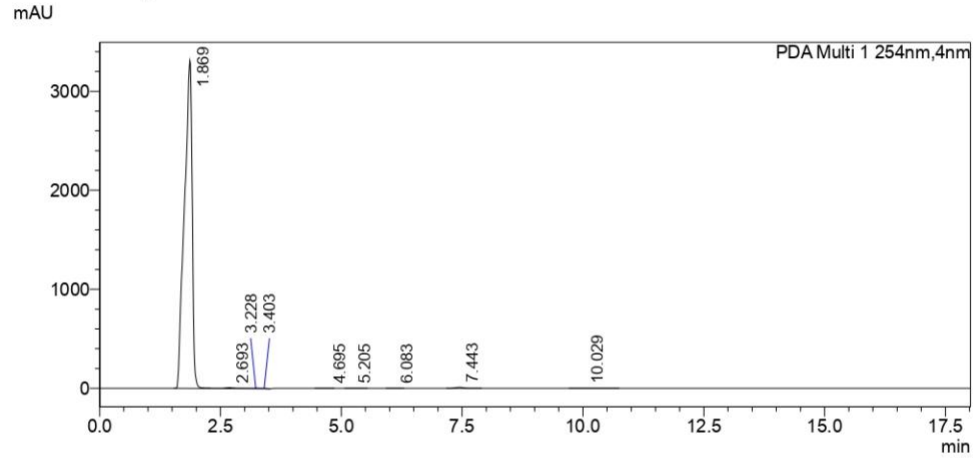
Dalam bahasa Inggris : "The authors acknowledge the facilities, scientific and technical support from IVD (*In Vitro Diagnosis*) and CD3 Laboratories, National Research and Innovation Agency through E-Layanan Sains, Badan Riset dan Inovasi Nasional.

SHIMADZU LabSolutions Analysis Report

<Sample Information>

Sample Name : std_500 ppm
 Sample ID : std
 Data Filename : std_500 ppm_007.lcd
 Method Filename : ELSA_AQ.lcm
 Batch Filename : PT_PP.lcb
 Vial # : 1-7
 Injection Volume : 10 uL
 Date Acquired : 18/11/2021 12:07:40
 Date Processed : 18/11/2021 12:25:42
 Sample Type : Unknown
 Acquired by : System Administrator
 Processed by : System Administrator

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch1 254nm

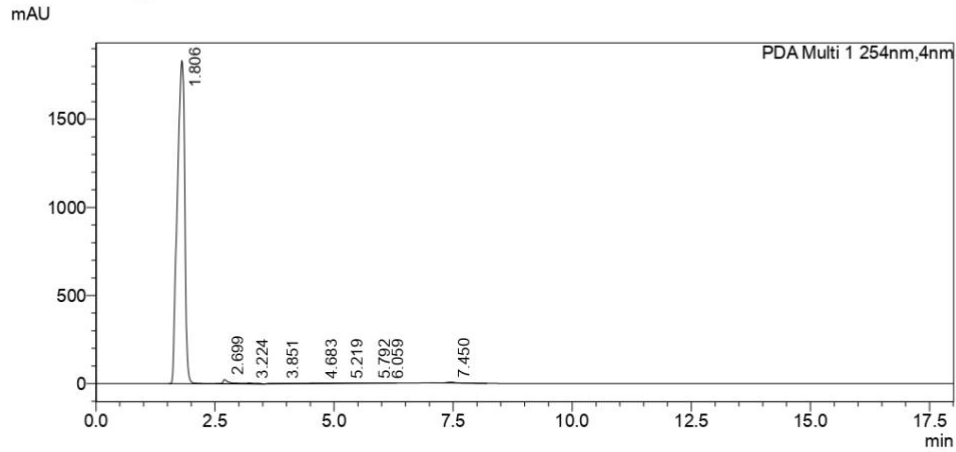
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	1.869	36831062	3309642	0.000		S	
2	2.693	90349	7185	0.000		T	
3	3.228	45821	4577	0.000		TV	
4	3.403	25118	3375	0.000		TV	
5	4.695	2886	322	0.000			
6	5.205	2948	345	0.000			
7	6.083	2172	237	0.000			
8	7.443	114144	10163	0.000			
9	10.029	11704	446	0.000			
Total		37126205	3336291				

SHIMADZU
LabSolutions Analysis Report

<Sample Information>

Sample Name	: std_250 ppm	Sample Type	: Unknown
Sample ID	: std		
Data Filename	: std_250 ppm_006.lcd	Acquired by	: System Administrator
Method Filename	: ELSA_AQ.lcm	Processed by	: System Administrator
Batch Filename	: PT_PP.lcb		
Vial #	: 1-6		
Injection Volume	: 10 uL		
Date Acquired	: 18/11/2021 11:49:13		
Date Processed	: 18/11/2021 12:07:14		

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch1 254nm

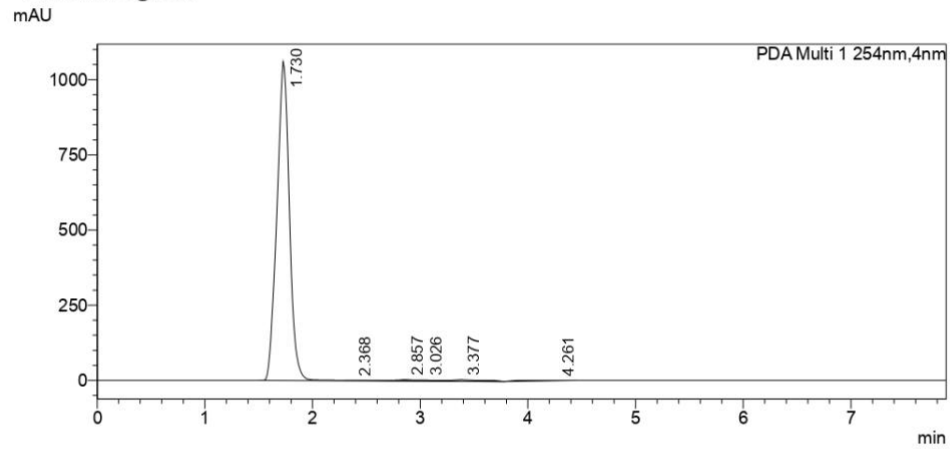
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	1.806	19859718	1830404	0.000		S	
2	2.699	210243	23147	0.000		T	
3	3.224	82978	5235	0.000		TV	
4	3.851	98100	3250	0.000			
5	4.683	120594	2364	0.000		V	
6	5.219	45697	1738	0.000		V	
7	5.792	43768	899	0.000		V	
8	6.059	5332	499	0.000		V	
9	7.450	99432	5782	0.000			
Total		20565862	1873319				

SHIMADZU
LabSolutions Analysis Report

<Sample Information>

Sample Name : std_100 ppm
 Sample ID :
 Data Filename : std_100 ppm_19112021_001.lcd
 Method Filename : ELSA_AQ.lcm
 Batch Filename : Antraquinon.lcb
 Vial # : 1-5
 Injection Volume : 10 uL
 Date Acquired : 19/11/2021 13:55:13
 Date Processed : 19/11/2021 14:03:07
 Sample Type : Unknown
 Acquired by : System Administrator
 Processed by : System Administrator

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	1.730	8630161	1059029	0.000		S	
2	2.368	2304	182	0.000		T	
3	2.857	45385	3806	0.000		TV	
4	3.026	31414	2443	0.000		TV	
5	3.377	103835	4673	0.000		TV	
6	4.261	64560	1190	0.000			
Total		8877658	1071324				

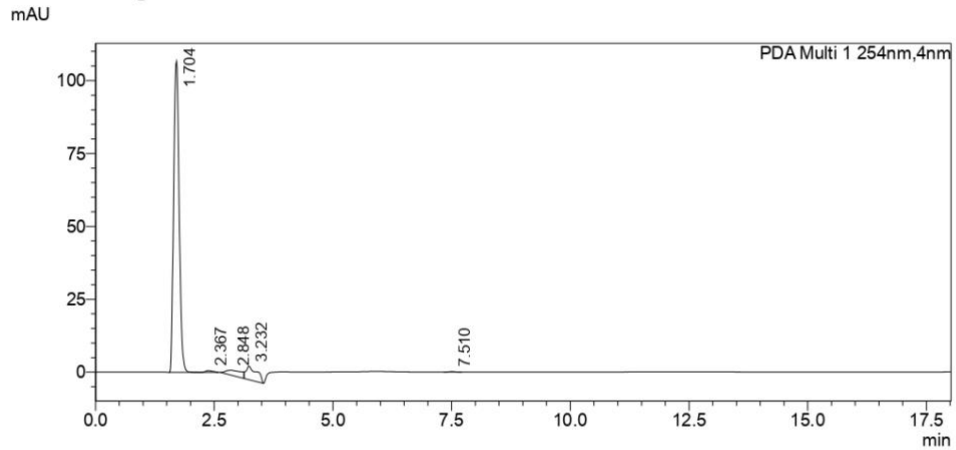
SHIMADZU
LabSolutions Analysis Report

<Sample Information>

Sample Name : std_50 ppm
 Sample ID : std
 Data Filename : std_50 ppm_004.lcd
 Method Filename : ELSA_AQ.lcm
 Batch Filename : PT_PP.lcb
 Vial # : 1-4
 Injection Volume : 10 uL
 Date Acquired : 18/11/2021 11:12:16
 Date Processed : 18/11/2021 11:30:19

Sample Type : Unknown
 Acquired by : System Administrator
 Processed by : System Administrator

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch1 254nm

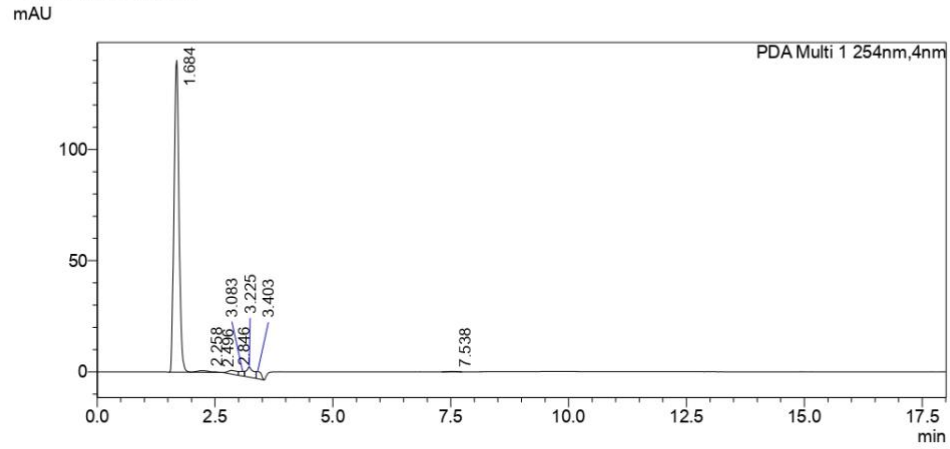
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	1.704	864089	106685	0.000			
2	2.367	7236	614	0.000		V	
3	2.848	42382	1688	0.000			
4	3.232	74203	4649	0.000		V	
5	7.510	2093	191	0.000			
Total		990004	113827				

SHIMADZU
LabSolutions Analysis Report

<Sample Information>

Sample Name	: std_25 ppm	Sample Type	: Unknown
Sample ID	: std	Acquired by	: System Administrator
Data Filename	: std_25 ppm_003.lcd	Processed by	: System Administrator
Method Filename	: ELSA_AQ.lcm		
Batch Filename	: PT_PP.lcb		
Vial #	: 1-3		
Injection Volume	: 10 uL		
Date Acquired	: 18/11/2021 10:53:48		
Date Processed	: 18/11/2021 12:08:49		

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch1 254nm							
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	1.684	1030983	140259	89.085			
2	2.258	12152	739	1.050		V	
3	2.496	1448	238	0.125		V	
4	2.846	23354	1648	2.018			
5	3.083	15481	2140	1.338		V	
6	3.225	49112	4454	4.244		V	
7	3.403	22308	3243	1.928		V	
8	7.538	2470	231	0.213			
Total		1157308	152952				

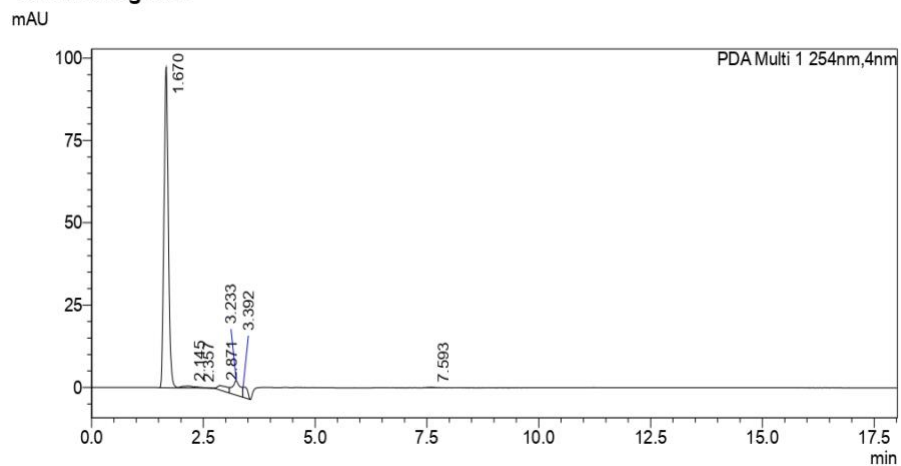


Analysis Report

<Sample Information>

Sample Name : std_10 ppm
 Sample ID : std
 Data Filename : std_10 ppm_002.lcd
 Method Filename : ELSA_AQ.lcm
 Batch Filename : PT_PP.lcb
 Vial # : 1-2
 Injection Volume : 10 uL
 Date Acquired : 18/11/2021 10:35:20
 Date Processed : 18/11/2021 13:09:09

Sample Type : Unknown
 Acquired by : System Administrator
 Processed by : System Administrator

<Chromatogram>

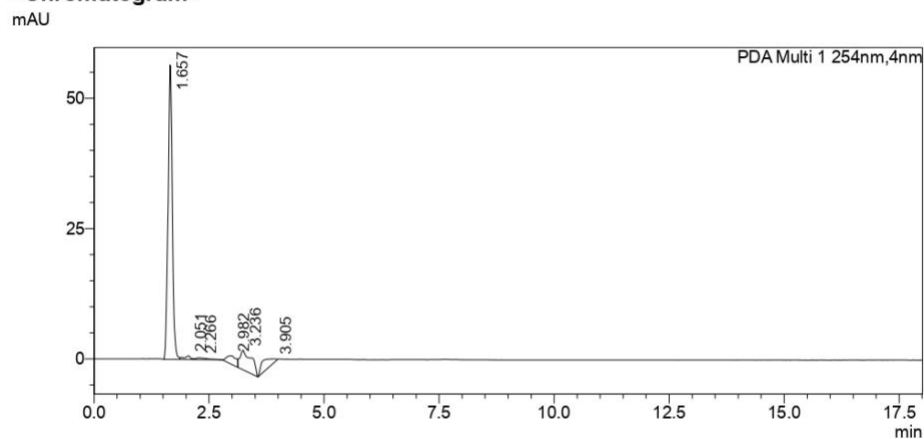
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	1.670	654232	97263	85.142			
2	2.145	9389	586	1.222		V	
3	2.357	3705	311	0.482		V	
4	2.871	23519	1347	3.061			
5	3.233	53376	4415	6.946		V	
6	3.392	22572	3074	2.937		V	
7	7.593	1610	142	0.210			
Total		768401	107137				

SHIMADZU
LabSolutions Analysis Report

<Sample Information>

Sample Name	: std_5 ppm	Sample Type	: Unknown
Sample ID	: std	Acquired by	: System Administrator
Data Filename	: std_5 ppm_001.lcd	Processed by	: System Administrator
Method Filename	: ELSA_AQ.Tcm		
Batch Filename	: PT_PP.Icb		
Vial #	: 1-1		
Injection Volume	: 10 uL		
Date Acquired	: 18/11/2021 10:16:52		
Date Processed	: 18/11/2021 10:34:54		

<Chromatogram>



<Peak Table>

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	1.657	359045	56461	0.000			
2	2.051	6810	671	0.000		V	
3	2.266	6027	354	0.000		V	
4	2.982	23154	1609	0.000			
5	3.236	65875	3716	0.000		V	
6	3.905	34400	800	0.000			
Total		495311	63611				

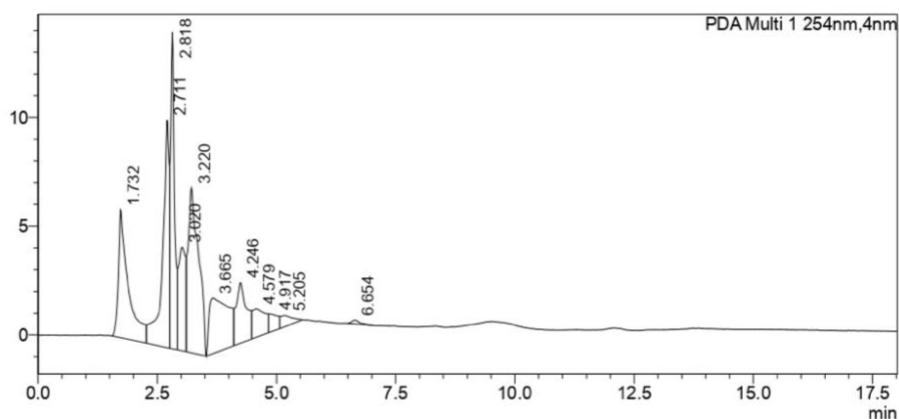
SHIMADZU
LabSolutions Analysis Report

<Sample Information>

Sample Name : sampel antraquinon
 Sample ID : sampel
 Data Filename : sampel antraquinon_008.lcd
 Method Filename : ELSA_AQ.lcm
 Batch Filename : PT_PP.lcb
 Vial # : 1-8
 Injection Volume : 10 uL
 Date Acquired : 18/11/2021 12:26:09
 Date Processed : 18/11/2021 12:44:12
 Sample Type : Unknown
 Acquired by : System Administrator
 Processed by : System Administrator

<Chromatogram>

mAU



<Peak Table>

PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	1.732	84455	5876	0.000			
2	2.711	101678	10472	0.000		V	
3	2.818	80339	14558	0.000		V	
4	3.020	47937	4768	0.000		V	
5	3.220	117155	7593	0.000		V	
6	3.665	70662	2565	0.000			
7	4.246	42314	2791	0.000		V	
8	4.579	23932	1310	0.000		V	
9	4.917	10087	773	0.000		V	
10	5.205	8824	481	0.000		V	
11	6.654	2072	187	0.000			
Total		589455	51372				

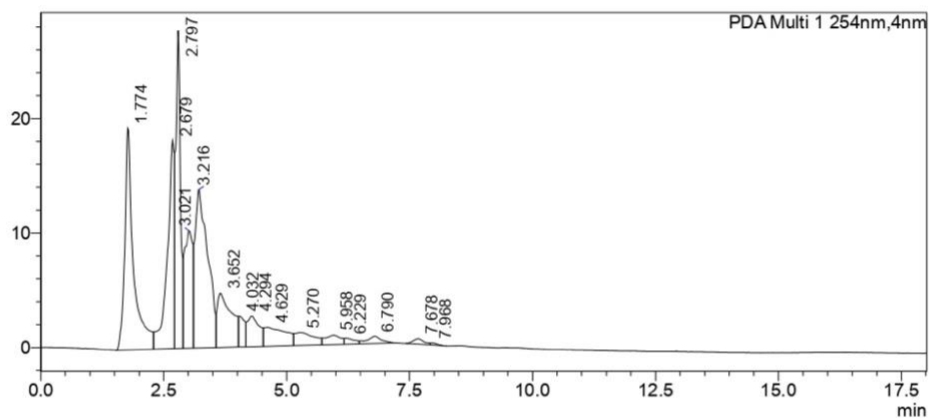
SHIMADZU
LabSolutions Analysis Report

<Sample Information>

Sample Name : sampel antrakuinon 2500 ppm
 Sample ID :
 Data Filename : sampel antrakuinon 2500 ppm_19112021_001.lcd
 Method Filename : ELSA_AQ.lcm
 Batch Filename : Antraquinon.lcb
 Vial # : 1-9
 Injection Volume : 10 uL
 Date Acquired : 19/11/2021 15:20:26
 Date Processed : 19/11/2021 15:38:29
 Sample Type : Unknown
 Acquired by : System Administrator
 Processed by : System Administrator

<Chromatogram>

mAU



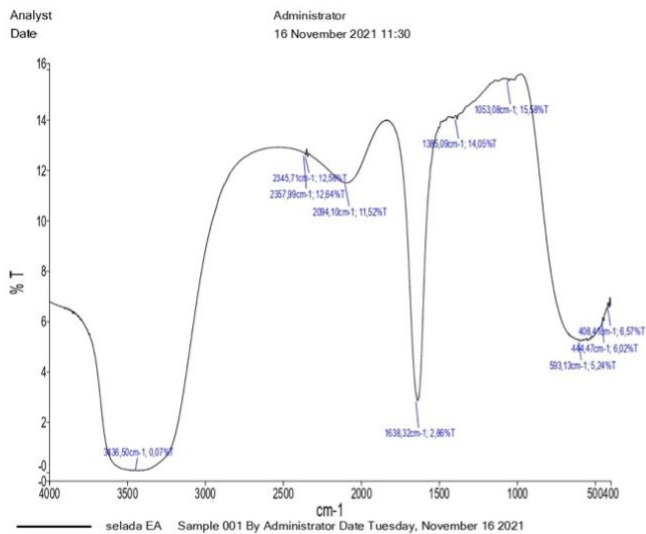
<Peak Table>

PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	1.774	237477	19362	0.000			
2	2.679	178502	18161	0.000		V	
3	2.797	178019	27769	0.000		V	
4	3.021	119719	10252	0.000		V	
5	3.216	248787	13839	0.000		V	
6	3.652	96398	4745	0.000		V	
7	4.032	21994	2687	0.000		V	
8	4.294	45321	2661	0.000		V	
9	4.629	50997	1647	0.000		V	
10	5.270	30718	1133	0.000		V	
11	5.958	17875	822	0.000		V	
12	6.229	7515	521	0.000		V	
13	6.790	13058	626	0.000		V	
14	7.678	7307	480	0.000			
15	7.968	1729	189	0.000		V	
Total		1255416	104895				

Lampiran 3. Spektra FTIR

PerkinElmer Spectrum Version 10.5.1
16 November 2021 11:30



Source Spectra Results	
Spectrum Name	Number Of Peaks
selada EA	10

Page 1

PerkinElmer Spectrum Version 10.5.1
16 November 2021 11:30

List of Peak Area/Height		
Peak Number	X (cm-1)	Y (%T)
1	3436.5	0,07
2	2357,99	12,64
3	2345,71	12,56
4	2094,1	11,52
5	1638,32	2,86
6	1385,09	14,05
7	1053,08	15,58
8	593,13	5,24
9	444,47	6,02
10	408,41	6,57

Page 2

Lampiran 4. Tabel Pita Serapan Infra Merah

Gugus	Senyawa	Frekuensi (cm ⁻¹)	Lingkungan spektral cm ⁻¹ (μ)	Nama lingkungannya
OH	Alkohol	3580-3650	3333-3704	
	Asam	2500-2700	(2,7-3,0μ)	
NH	Amina primer dan sekunder	-3500		
	Amida	3310-3500		
		3140-3320	2857-3333 (3,0-3,5 μ)	Lingkungan vibrasi ulur hidrogen
CH	Alkana	3300		
	Alkena	3010-3095		
	Aromatik	-3030		
	Alkana	2853-2962		
	Aldehida	2700-2900	2500-2857 (4,0-4,5 μ)	
SH	Sulfur	2500-2700		
C=C	Alkana	2190-2260		
C≡N	Alkilnitril	2240-2260	2222-2500 (4,5-5,0 μ)	Lingkungan ikatan ganda tiga
-N=C=N	Iosianat	2240-2275		
	Arilnitril	2220-2240		
	Diimida	2130-2155	2000-2222 (5,0-5,5 μ)	
-N ₃	Azida	2120-2160		
>CO	Aldehid	1720-1740	(818-2000) (5,5-6,0 μ)	
	Keton	1675-1725		
	Asam karboksilat	1700-1725		
	Ester	2000-2300		
	Asilhalida	1755-1850	1667-1818 (6,0-6,5 μ)	Lingkungan ikatan ganda dua
CN	Amida	1670-1700		
	Oksim	1640-1690		
CO	β-diketon	1540-1640		
C=O	Ester	1650		
C=C	Alkena	1620-1680		
N-H(b)	Amina	1575-1650	1538-1667	
-N=N-	Azo	1575-1630	(6,5-7,5 μ)	Daerah sidik jari
-C-NO ₂	Nitro	1550-1570	1538-1667	
-C-NO ₂	Nitro aromatik	1300-1570		
C-O-C	Eter	1230-1270	1053-1333 (7,5-9,5 μ)	
-(CH ₂) _n	Senyawaan lain	-722	666-900 (11-15,0 μ)	

Lampiran 5. Data OAT BACTEC 960

BACTEC MGIT 960
Unloaded AST Set Report

Instrument Number	Current Date/Time	Temperature			Software Version	Page Number
		A	B	C		
1	10/01/2022 13:36	36.5°C	36.7°C	36.7°C	V6.01B	1

Sequence No: 439880035696 TIP:11;11 SOP: 28/12/2021 10:35 Removed Date:10/01/2022

Tube Position	Growth Unit	Status	Concentration	Drug Name
A/R01	400	C		Growth Control
A/R02	400	C	ug/mL	Undefined Drug #1
A/R03	400	C	ug/mL	Undefined Drug #2
A/R04	0	C	ug/mL	Undefined Drug #3
A/R05	0	C	ug/mL	Undefined Drug #4
A/R06	0	C	ug/mL	Undefined Drug #5
A/R07	0	C	ug/mL	Undefined Drug #6
A/R08	0	C	ug/mL	Undefined Drug #7

Sequence No: 439880035697 TIP:11;11 SOP: 28/12/2021 10:36 Removed Date:10/01/2022

Tube Position	Growth Unit	Status	Concentration	Drug Name
A/R09	400	C		Growth Control
A/R10	400	C	ug/mL	Undefined Drug #1
A/R11	400	C	ug/mL	Undefined Drug #2
A/R12	0	C	ug/mL	Undefined Drug #3
A/R13	0	C	ug/mL	Undefined Drug #4
A/R14	0	C	ug/mL	Undefined Drug #5
A/R15	0	C	ug/mL	Undefined Drug #6
A/R16	0	C	ug/mL	Undefined Drug #7

END OF AST SETS

Keterangan:

(01) GC Kontrol positif;

(02) *Rifampicin*,

(03) *Streptomycin*;

(04) Isoniazid 0,1 ppm;

(05) Isoniazid 0,4 ppm;

(06) Moxifloxacin;

(7) Levofloxacin

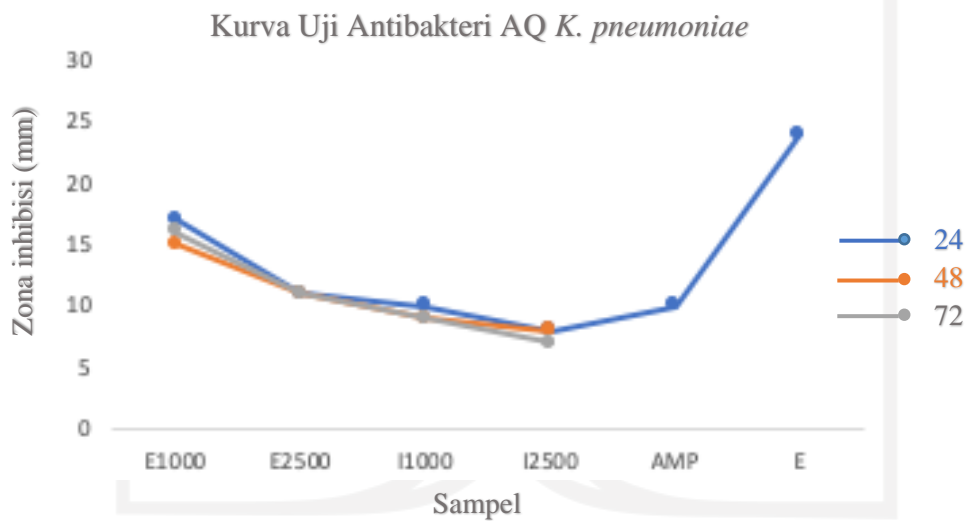
Lampiran 6. Hasil uji senyawa AQ sebagai Anti-TB

BACTEC MGIT 960						
Unloaded AST Set Report						
Instrument Number	Current Date/Time	Temperature A	Temperature B	Temperature C	Software Version	Page Number
1	17/01/2022 09:35	36.6°C	36.9°C	36.4°C	V6.01B	1
Sequence No: 439550132728 SALADA TIP:10;15 SOP: 05/01/2022 11:32 Removed Date:17/01/2022						
Tube Position	Growth Unit	Status	Concentration	Drug Name		
C/G01	400	C		Growth Control	= Kontrol Positif	
C/G02	400	C	ug/mL	Undefined Drug	#1 = ISOLAT 1000 ppm	(R)
C/G03	400	C	ug/mL	Undefined Drug	#2 = ISOLAT 2500 ppm	(R)
C/G04	400	C	ug/mL	Undefined Drug	#3 = EKSTRAK 1000 ppm	(R)
C/G05	400	C	ug/mL	Undefined Drug	#4 = EKSTRAK 2500 ppm	(R)
Sequence No: 439550132352 SALADA (Dipro) TIP: 9;22 SOP: 05/01/2022 11:32 Removed Date:17/01/2022						
Tube Position	Growth Unit	Status	Concentration	Drug Name		
C/G06	400	C		Growth Control	= Kontrol Positif	
C/G07	400	C	ug/mL	Undefined Drug	#1 = ISOLAT 1000 ppm	(R)
C/G08	400	C	ug/mL	Undefined Drug	#2 = ISOLAT 2500 ppm	(R)
C/G09	400	C	ug/mL	Undefined Drug	#3 = EKSTRAK 1000 ppm	(R)
C/G10	400	C	ug/mL	Undefined Drug	#4 = EKSTRAK 2500 ppm	(R)

Lampiran 7. Data Antibakteri

A. *Klebsiella pneumoniae*

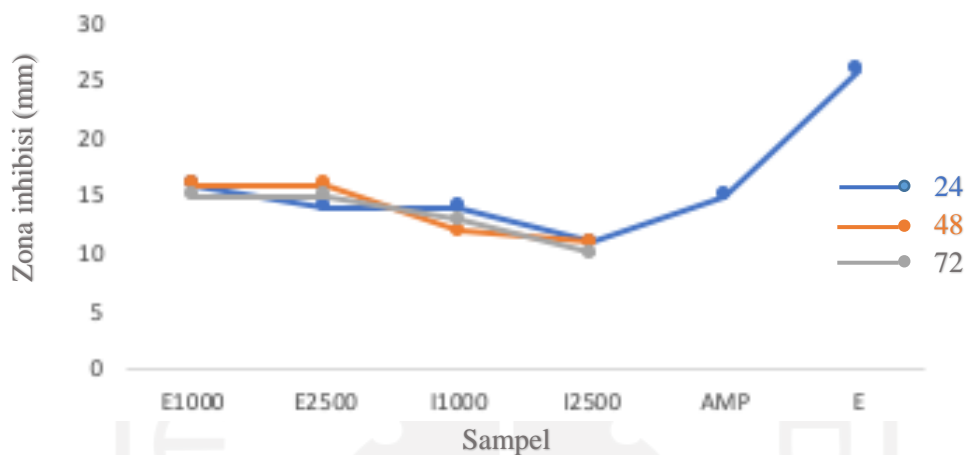
Sampel (ppm)	Inhibisi (mm)			Antibiotik	
	24 jam	48 jam	72 jam	<i>Ampicillin</i>	<i>Erithromicyn</i>
Ekstrak 1000	17	15	16	10	24
Ekstrak 2500	11	11	11		
Isolat 1000	10	9	9		
Isolat 2500	8	8	7		



B. *Streptococcus pyogenes*

Sampel (ppm)	Inhibisi (mm)			Antibiotik	
	24 jam	48 jam	72 jam	<i>Ampicillin</i>	<i>Erithromicyn</i>
Ekstrak 1000	16	16	15	15	26
Ekstrak 2500	14	16	15		
Isolat 1000	14	12	13		
Isolat 2500	11	11	10		

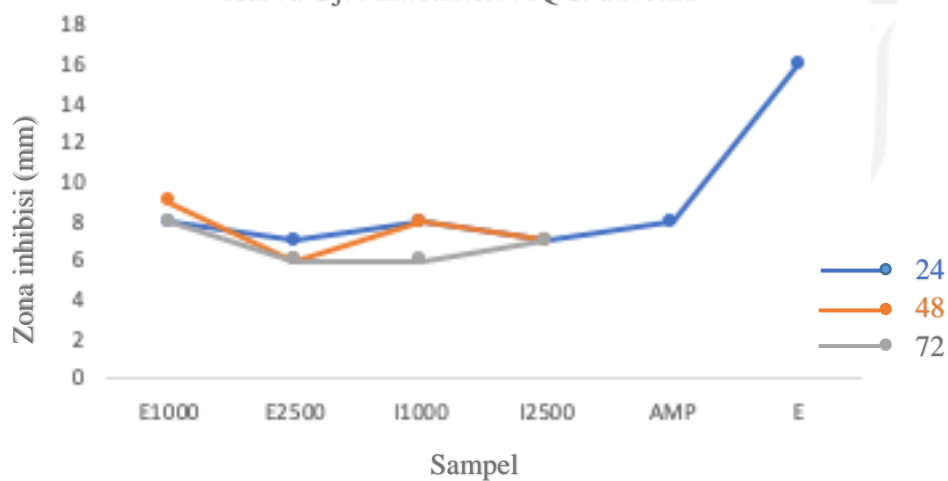
Kurva Uji Antibakteri AQ *S. pyogenes*



C. *Staphylococcus aureus*

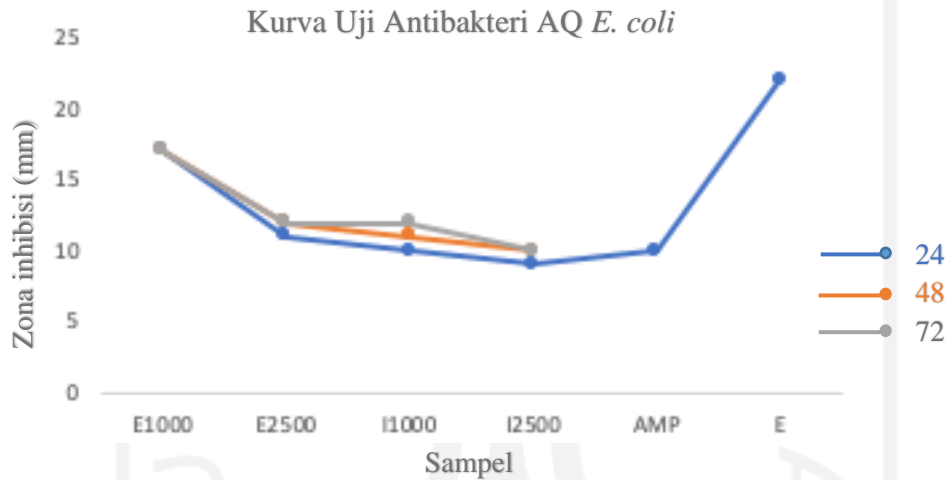
Sampel (ppm)	Inhibisi (mm)			Antibiotik	
	24 jam	48 jam	72 jam	Ampicillin	Erithromicyn
Ekstrak 1000	8	9	8	8	16
Ekstrak 2500	7	6	6		
Isolat 1000	8	8	6		
Isolat 2500	7	7	7		

Kurva Uji Antibakteri AQ *S. aureuss*



D. *Escherichia coli*

Sampel (ppm)	Inhibisi (mm)			Antibiotik	
	24 jam	48 jam	72 jam	Ampicillin	Erithromicyn
Ekstrak 1000	17	17	17	10	22
Ekstrak 2500	11	12	12		
Isolat 1000	10	11	12		
Isolat 2500	9	10	10		



Lampiran 8. Sertificate Of Analysis Anthraquinone



Specification

8.00465.0500 Anthraquinone for synthesis

	Specification	
Assay (HPLC, area%)	≥ 98.0	% (a/a)
Identity (IR)	passes test	

Dr. Jörg Bauer
Responsible laboratory manager quality control

This document has been produced electronically and is valid without a signature.

Lampiran 9. Perhitungan

1. Perhitungan % Rendemen Ekstrak

Jenis Ekstrak	Massa Sampel Awal (gram)	Massa Ekstrak (gram)	Rendemen (%)
Ekstrak Aquades	20	2,95	14,75 %
Ekstrak Metanol	20	2,76	13,8 %
Ekstrak Etanol	20	2,13	10,65 %
Ekstrak Etil Asetat	20	2,98	14,9 %

- Ekstrak Aquades

$$\text{Rendemen} = \frac{2,95}{20} \times 100 \% = 14,75 \%$$

- Ekstrak Metanol

$$\text{Rendemen} = \frac{2,76}{20} \times 100 \% = 13,8 \%$$

- Ekstrak Etanol

$$\text{Rendemen} = \frac{2,13}{20} \times 100 \% = 10,65 \%$$

- Ekstrak Etil Asetat

$$\text{Rendemen} = \frac{2,98}{20} \times 100 \% = 14,9 \%$$

2. Perhitungan KOH 5 N

Diketahui, N = 5 mol ek/L; Mr KOH = 56 g/mol; V = 0,01 L

Dicari m (g)?

$$\text{Normalitas (N)} = \frac{\text{massa zat (g)} \times e}{\text{Mr} \times \text{Volume (L)}}$$

$$5 \text{ N} = \frac{\text{massa zat (g)} \times (1)}{56 \text{ g/mol} \times 0,01 \text{ L}}$$

$$\text{Massa zat} = 2,8 \text{ g}$$

3. Analisis Data Metode Kalibrasi Standar

a. Perhitungan

- Pembuatan deret Standar Anthraquinone (AQ)

1) Larutan induk AQ 1000 ppm dalam 50 mL

$$\text{ppm} = \frac{m \text{ (g)}}{v \text{ (L)}} \quad 1000 \text{ ppm} = \frac{m \text{ (mg)}}{0,05 \text{ L}}$$
$$m = 50 \text{ mg}/0,05 \text{ gram}$$

2) Deret Standar Anthraquinone (AQ)

Rumus Pengenceran :

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

Keterangan

V : Volume (mL)

M : Molaritas

- Standar 100 ppm dalam 10 mL
 $V_1 \cdot 1000 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \cdot 100 \text{ ppm}$
 $V_1 = 1 \text{ mL}$
- Standar 50 ppm dalam 10 mL
 $V_1 \cdot 1000 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \cdot 50 \text{ ppm}$
 $V_1 = 0,5 \text{ mL}$
- Standar 25 ppm dalam 10 mL
 $V_1 \cdot 1000 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \cdot 25 \text{ ppm}$
 $V_1 = 0,25 \text{ mL}$
- Standar 10 ppm dalam 10 mL
 $V_1 \cdot 1000 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \cdot 10 \text{ ppm}$
 $V_1 = 0,1 \text{ mL}$
- Standar 5 ppm dalam 10 mL
 $V_1 \cdot 1000 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \cdot 5 \text{ ppm}$
 $V_1 = 0,05 \text{ mL}$

- Pembuatan Sampel 1000 ppm

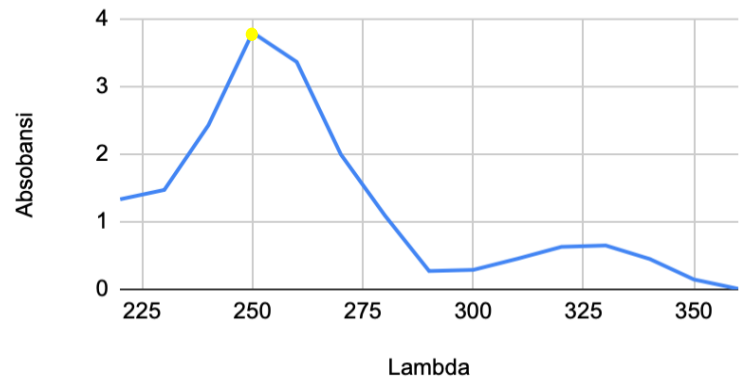
$$1000 \text{ ppm} = \frac{m \text{ (mg)}}{0,01 \text{ L}}$$
$$m = 10 \text{ mg}/0,01 \text{ g}$$

*) Ket : 4 sampel ekstrak (Aq; MeOH; EtOH; Ea) dibuat dalam konsentrasi dan volume larutan yang sama.

b. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Lambda (nm)	Absorbansi
220	1.328
230	1.466
240	2.421
250	3.789
260	3.355
270	1.990
280	1.087
290	0.269
300	0.286
310	0.450
320	0.626
330	0.646
340	0.446
350	0.144
360	0.007

Abs vs. Lambda



Kurva Abs vs Lambda

Keterangan :

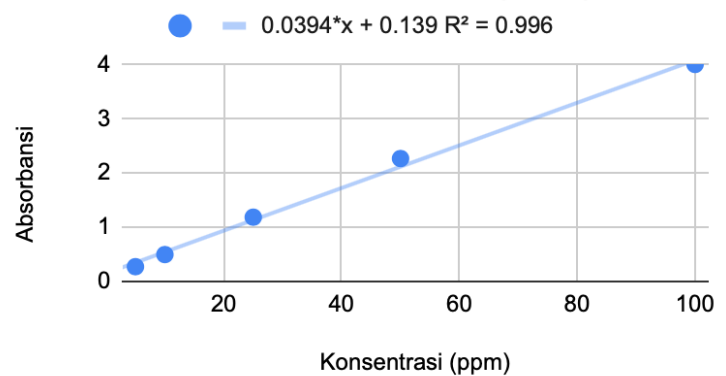
250 nm adalah Panjang gelombang maksimum dari AQ standar 1000 ppm, sehingga digunakan sebagai lambda pada analisis sampel untuk metode kalibrasi.

c. Analisis sampel

Standar Anthraquinone (AQ)

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
Blangko	0
5	0.261
10	0.486
25	1.176
50	2.261
100	4.000

Absorbansi vs. Konsentrasi (ppm)



Kurva Abs vs Konsentrasi

Ekstrak Sampel

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
Sampel Aq	0.117
Sampel MeOH	0.144
Sampel EtOH	0.096
Sampel Ea	0.214

Hasil persamaan garis lurus:

$$y = bx + a$$

$$y = 0,0394x + 0,139$$

$$R^2 = 0,996$$

Perhitungan kadar AQ (ppm) dalam Setiap Ekstrak

- Ekstrak Aq

$$y = 0.0394x + 0.139$$

$$0.769 = 0.0394x + 0.139$$

$$0.769 - 0.139 = 0.0394x$$

$$x = 16.1538 \text{ ppm}$$

- Ekstrak EtOH

$$y = 0.0394x + 0.139$$

$$0.731 = 0.0394x + 0.139$$

$$0.731 - 0.139 = 0.0394x$$

$$x = 15.1795 \text{ ppm}$$

- Ekstrak MeOH

$$y = 0.0394x + 0.139$$

$$1.297 = 0.0394x + 0.139$$

$$1.297 - 0.139 = 0.0394x$$

$$x = 29.6923 \text{ ppm}$$

- Ekstrak Ea

$$y = 0.0394x + 0.139$$

$$1.464 = 0.0394x + 0.139$$

$$1.464 - 0.139$$

$$= 0.0394x$$

$$x = 33.9744 \text{ ppm}$$

*) Ket : Ekstrak Ea memiliki kadar AQ tertinggi

4. Analisis Data Metode Penentuan Antioksidan (DPPH)

*) Penentuan antioksidan Ekstrak Ea dengan kadar AQ total tertinggi

a. Perhitungan

- Pembuatan deret Standar Ekstrak Ea

1) Larutan induk ekstrak Ea 100 ppm dalam 10 mL

$$\text{ppm} = \frac{m \text{ (g)}}{v \text{ (L)}} \quad 100 \text{ ppm} = \frac{m \text{ (mg)}}{0,01 \text{ L}}$$

$$m = 10 \text{ mg}/0,01 \text{ gram}$$

2) Deret Standar Ekstrak Ea

Rumus Pengenceran :

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

Keterangan

V : Volume (mL)

M : Molaritas

- Standar 13 ppm dalam 10 mL
 $V_1 \cdot 100 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \cdot 13 \text{ ppm}$
 $V_1 = 1,3 \text{ mL}$
- Standar 11 ppm dalam 10 mL
 $V_1 \cdot 100 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \cdot 11 \text{ ppm}$
 $V_1 = 1,1 \text{ mL}$
- Standar 9 ppm dalam 10 mL
 $V_1 \cdot 100 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \cdot 9 \text{ ppm}$
 $V_1 = 0,9 \text{ mL}$
- Standar 7 ppm dalam 10 mL
 $V_1 \cdot 100 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \cdot 7 \text{ ppm}$
 $V_1 = 0,7 \text{ mL}$

- Pembuatan DPPH 50 ppm dalam 50 mL

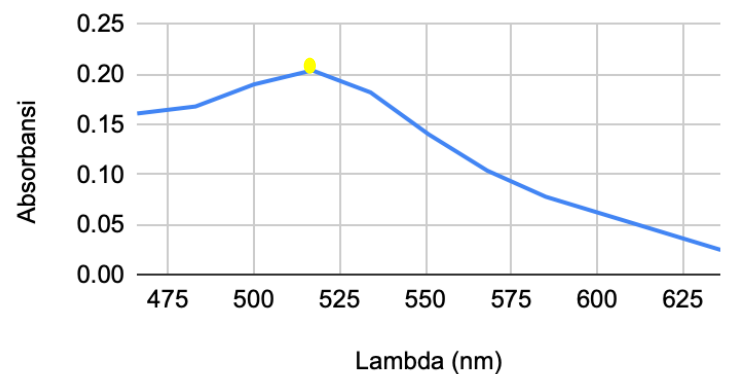
$$50 \text{ ppm} = \frac{m \text{ (mg)}}{0,05 \text{ L}}$$

$$m = 2,5 \text{ mg} / 0,0025 \text{ g}$$

d. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Lambda (nm)	Absorbansi
466	0.161
483	0.168
500	0.190
517	0.204
534	0.182
551	0.140
568	0.104
585	0.078
636	0.025

Absorbansi vs. Lambda (nm)



Kurva Abs vs Lambda

Keterangan :

517 nm adalah Panjang gelombang maksimum dari DPPH 50 ppm dalam metanol, sehingga digunakan sebagai lambda pada analisis sampel Ekstrak Ea untuk metode penentuan antioksidan.

e. Analisis sampel

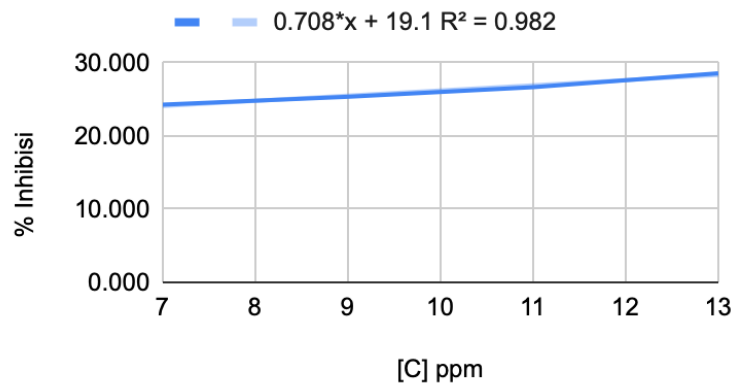
1 mL Ekstrak Ea (setiap konsentrasi) + 3 mL DPPH 100 ppm

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi			Σ Absorbansi	% Inhibisi
Blangko	0,280	0,280	0,280	0,280	-
7	0.212	0.212	0.212	0.212	24.286
9	0.209	0.209	0.209	0.209	25.357
11	0.205	0.205	0.206	0.205	26.667
13	0.200	0.200	0.200	0.200	28.571

Kurva Inhibisi

Konsentrasi (ppm)	% Inhibisi
7	24.286
9	25.357
11	26.667
13	28.571

% Inhibisi vs. [C] ppm



Kurva % Inhibisi vs Konsentrasi

Persamaan garis lurus:

$$y = bx + a$$

$$y = 0,708x + 19,1$$

$$R^2 = 0,982$$

Perhitungan Nilai IC50

$$\text{Rumus \% Inhibisi} = \frac{\text{Abs control} - \text{Abs sampel}}{\text{Abs control}} \times 100\%$$

$$\text{IC50 } y = bx + a \text{ dengan } y = 50$$

$$y = 0,708x + 19,1$$

$$50 = 0,708x + 19,1$$

$$50 - 19,1 = 0,7084x$$

$$x = 43,64$$

5. Analisis KCKT

Perhitungan

- Pembuatan deret Standar teknis AQ

3) Larutan induk AQ 1000 ppm dalam 1,5 mL

$$\text{ppm} = \frac{m \text{ (g)}}{v \text{ (L)}} \quad 1000 \text{ ppm} = \frac{m \text{ (mg)}}{0,0015 \text{ L}}$$
$$m = 1,5 \text{ mg}/0,015 \text{ gram}$$

4) Deret Standar teknis AQ

Rumus Pengenceran :

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

Keterangan

V : Volume (mL)

M : Molaritas

- Standar 500 ppm dalam 1,5 mL
 $V_1 \cdot 1000 \text{ ppm} = 1,5 \text{ mL} \cdot 500 \text{ ppm}$
 $V_1 = 0,75 \text{ mL}$
- Standar 250 ppm dalam 1,5 mL
 $V_1 \cdot 1000 \text{ ppm} = 1,5 \text{ mL} \cdot 250 \text{ ppm}$
 $V_1 = 0,375 \text{ mL}$
- Standar 100 ppm dalam 1,5 mL
 $V_1 \cdot 1000 \text{ ppm} = 1,5 \text{ mL} \cdot 100 \text{ ppm}$
 $V_1 = 0,15 \text{ mL}$
- Standar 50 ppm dalam 1,5 mL
 $V_1 \cdot 1000 \text{ ppm} = 1,5 \text{ mL} \cdot 50 \text{ ppm}$
 $V_1 = 0,075 \text{ mL}$
- Standar 25 ppm dalam 1,5 mL
 $V_1 \cdot 1000 \text{ ppm} = 1,5 \text{ mL} \cdot 25 \text{ ppm}$
 $V_1 = 0,0375 \text{ mL}$
- Standar 10 ppm dalam 1,5 mL
 $V_1 \cdot 1000 \text{ ppm} = 1,5 \text{ mL} \cdot 10 \text{ ppm}$
 $V_1 = 0,015 \text{ mL}$
- Standar 5 ppm dalam 1,5 mL
 $V_1 \cdot 1000 \text{ ppm} = 1,5 \text{ mL} \cdot 5 \text{ ppm}$
 $V_1 = 0,0075 \text{ mL}$

- Pembuatan Induk Isolat 6000 ppm dalam 10 mL

$$6000 \text{ ppm} = \frac{m \text{ (mg)}}{0,01 \text{ L}}$$
$$m = 60 \text{ mg}/0,06 \text{ g}$$

- Pembuatan sampel 2500 dan 1000 ppm dalam 1,5 mL
 - Sampel 2500 ppm dalam 1,5 mL
 - Sampel 1000 ppm dalam 1,5 mL
$$V_1 \cdot 6000 \text{ ppm} = 1,5 \text{ mL} \cdot 2500 \text{ ppm} \quad V_1 \cdot 1000 \text{ ppm} = 1,5 \text{ mL} \cdot 1000 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 0,625 \text{ mL} \quad V_1 = 0,25 \text{ mL}$$
- Perhitungan % Rendemen Isolat

Nama isolat	Massa Sampel Awal (ppm)	Massa AQ (ppm)	Rendemen (%)
Isolat 1000	1000	7,17	0,717 %
Isolat 2500	2500	9,18	0,367 %

- Isolat 1000

$$\text{Rendemen} = \frac{7,17}{1000} \times 100 \% = 14,75 \%$$
- Isolat 2500

$$\text{Rendemen} = \frac{9,18}{2500} \times 100 \% = 13,8 \%$$

6. Perhitungan nilai *Reterdation Factor* (RF)

$$\text{RF} = \frac{a}{b} \quad \text{dimana, } a = \text{Jarak noda dari awal totalan}$$

$$b = \text{Jarak elusi senyawa}$$

- Penentuan Eluen

$$\text{a. RF} = \frac{3,4 \text{ cm}}{6 \text{ cm}} = 0,56 \text{ cm}$$

$$\text{b. RF} = \frac{4,7 \text{ cm}}{6 \text{ cm}} = 0,78 \text{ cm}$$

$$\text{c. RF} = \frac{5,3 \text{ cm}}{6 \text{ cm}} = 0,88 \text{ cm}$$

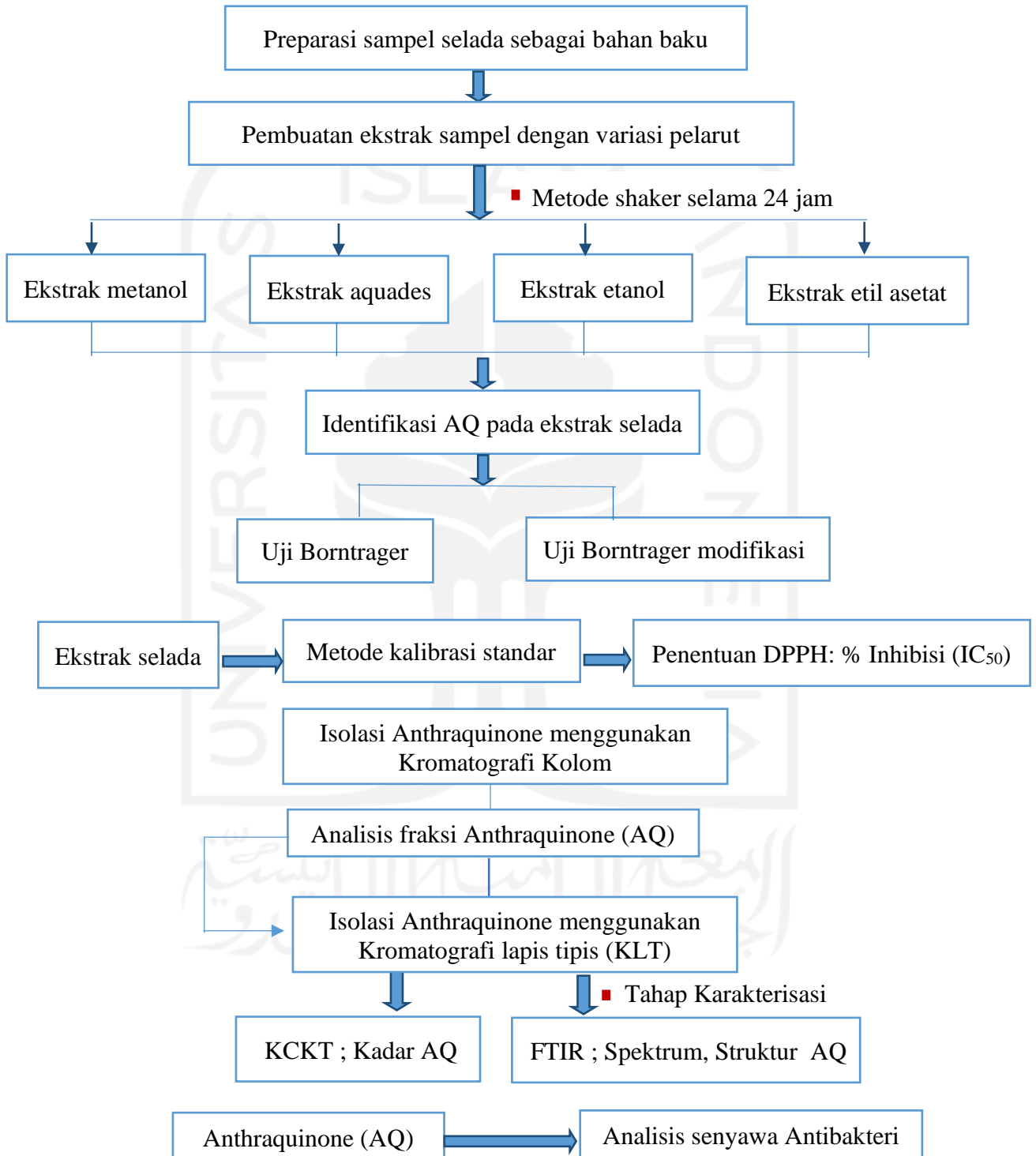
- Senyawa AQ

$$\text{a. RF} = \frac{5,1 \text{ cm}}{6 \text{ cm}} = 0,85 \text{ cm (Standar)}$$

$$\text{b. RF} = \frac{5,2 \text{ cm}}{6 \text{ cm}} = 0,86 \text{ cm (Fraksi 93)}$$

$$\text{c. RF} = \frac{6 \text{ cm}}{6 \text{ cm}} = 1 \text{ cm (Fraksi 98)}$$

Lampiran 10. Diagram Alir Skema Penelitian



Lampiran 11. Timeline Penelitian

No	Kegiatan	Bulan							
		1	2	3	4	5	6	7	8
1.	Preparasi sampel ekstrak daun selada hijau								
2.	Identifikasi ekstrak daun selada hijau								
3.	Penentuan kadar total AQ pada ekstrak selada menggunakan instrumen Spektrofotometer UV-VIS								
4.	Uji daya antioksidan dengan DPPH menggunakan instrumen Spektrofotometer UV-VIS								
5.	Isolasi AQ dari ekstrak selada dan Analisis isolat dan kadar AQ menggunakan instrumen KCKT								
6.	Analisis struktur AQ menggunakan instrumen FTIR								
7.	Uji aktivitas AQ sebagai antibakteri								

Lampiran 12. Dokumentasi Penelitian

a. Preparasi sampel



Tanaman Selada Hijau



Setelah dicuci dan dipisahkan dari batang juga akarnya



Simplisia untuk metode kriogenik

b. Metode *Freeze Dry*



Alat *freeze dry* terpasang labu kaca berisi daun selada yang telah dibekukan di -80°C selama 24 jam.



Saat *final drying* 48 jam

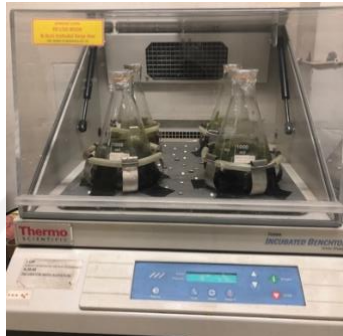


Daun selada hijau (setelah penghilangan air)



Serbuk daun selada hijau

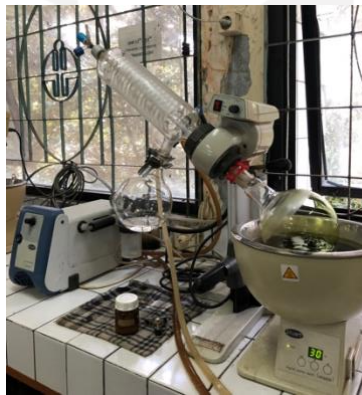
c. Ekstraksi Daun Selada Hijau (*Lactuca sativa* L.)



Incubator shaker



4 Ekstrak yang dimaserasi



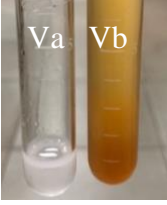
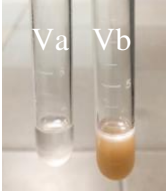
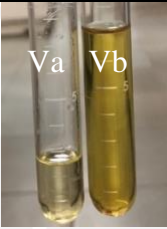
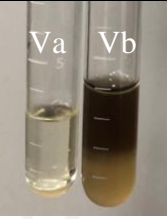
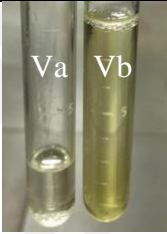
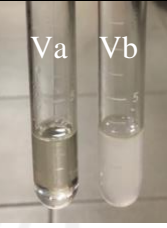
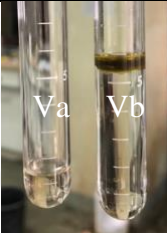
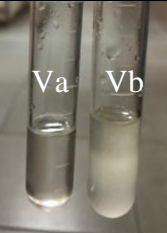
Rangkaian *Vacum rotary evaporator*



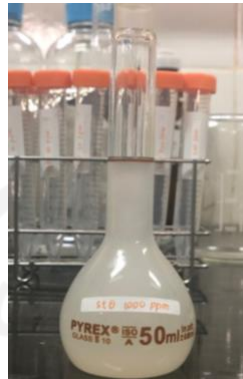
Maserat Ekstrak

d. Identifikasi Daun Selada Hijau (*Lactuca sativa* L.)

Jenis Sampel	Uji Borntrager	Borntrager Modifikasi
Standar AQ Teknis		

Ekstrak Aquades	 <p>Positif AQ (endapan orange kemerahan)</p>	 <p>Positif AQ (endapan orange kemerahan)</p>
Ekstrak MeOH	 <p>Positif AQ (larutan warna kuning dan ada cincin merah ditengah atasnya)</p>	 <p>Positif AQ (bagian bawah larutan warna kuning)</p>
Ekstrak EtOH	 <p>Positif AQ (Bagian bawah larutan warna kuning)</p>	 <p>Positif AQ (Bagian bawah larutan warna putih tulang seperti standar)</p>
Ekstrak Ea	 <p>Positif AQ (Bagian atas larutan warna kuning gelap kehijauan)</p>	 <p>Positif AQ (Bagian bawah larutan warna putih tulang seperti standar)</p>

e. Penentuan kadar AQ dari ekstrak dengan Kalibrasi Standar



Pembuatan larutan standar



Deret pengenceran larutan standar

f. Penentuan antioksidan ekstrak Ea



Blangko (Metanol)



Sampel 7 ppm



Sampel 9 ppm



Sampel 11 ppm

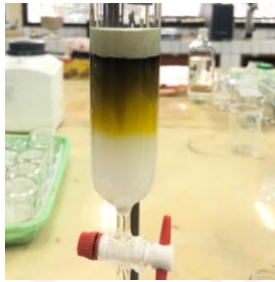


Sampel 13 ppm

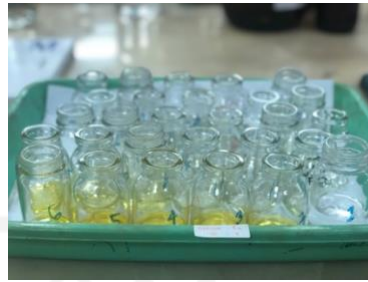
g. Isolasi kolom kromatografi

Proses pencampuran celite dengan sampel ekstrak Ea





n-Heksan : Ea (10:1)



Hasil Fraksi 1-42



n-Heksan : Ea (5:1)



Hasil Fraksi 43-82



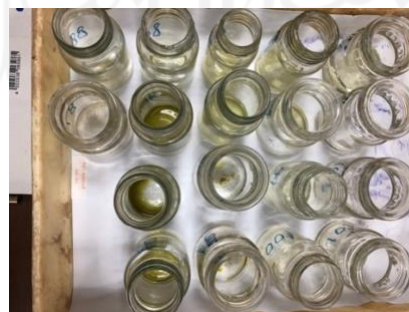
n-Heksan : Ea (2:1)



Hasil Fraksi 82-90

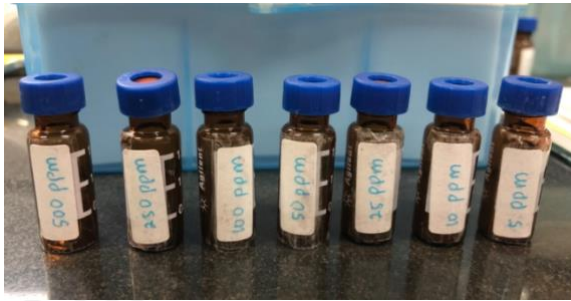


Etil asetat



Hasil Fraksi 91-104

h. Analisis KCKT



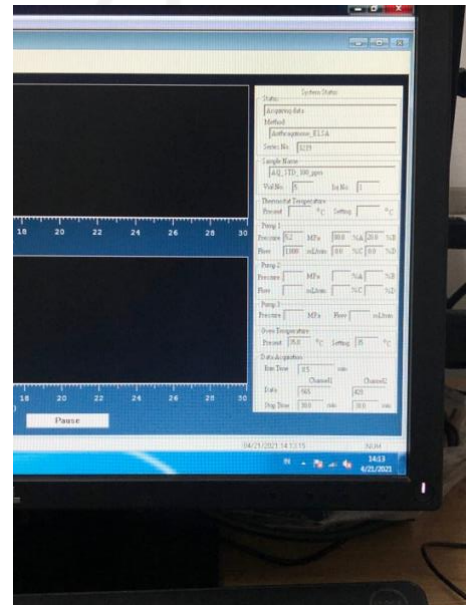
7 Konsentrasi Standar teknis AQ



Sampel Isolat AQ



Alat KCKT



Software KCKT

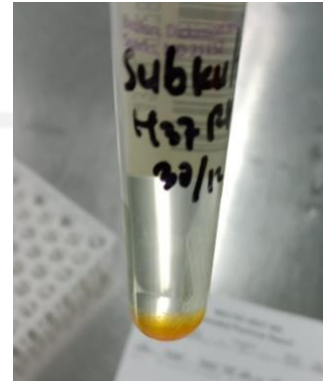
i. Instrument FTIR-UATR PerkinElmer



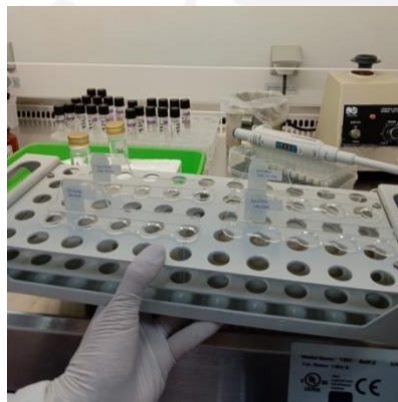
j. Proses Uji Aktivitas dengan BACTEC 960



Uji sterilisasi stok sampel



Subkultur H37Rv



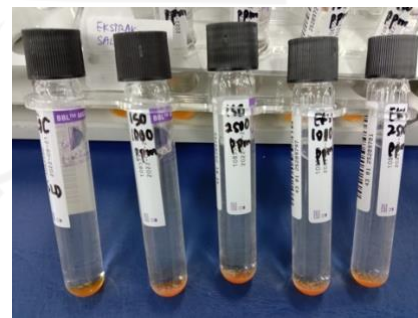
Rak AST



Tabung diposisikan pada alat

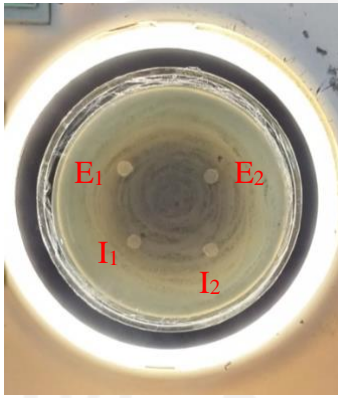
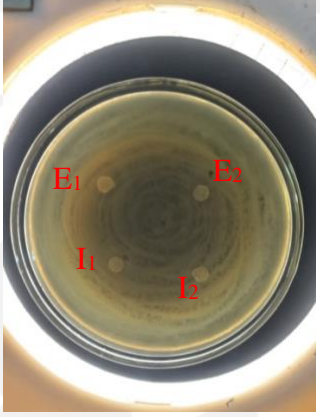
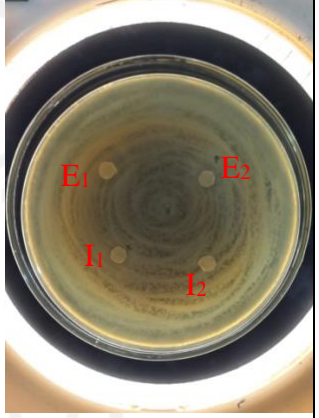
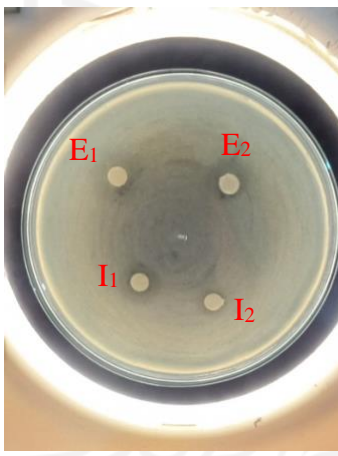
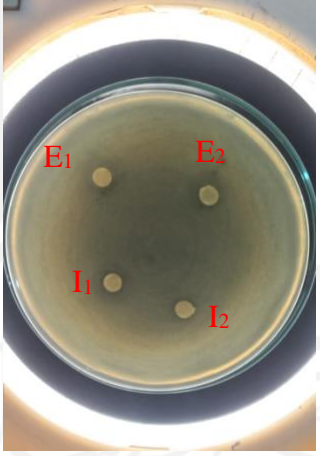
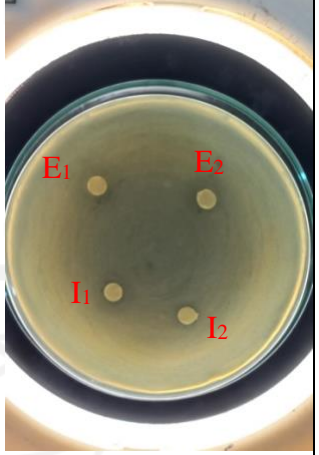


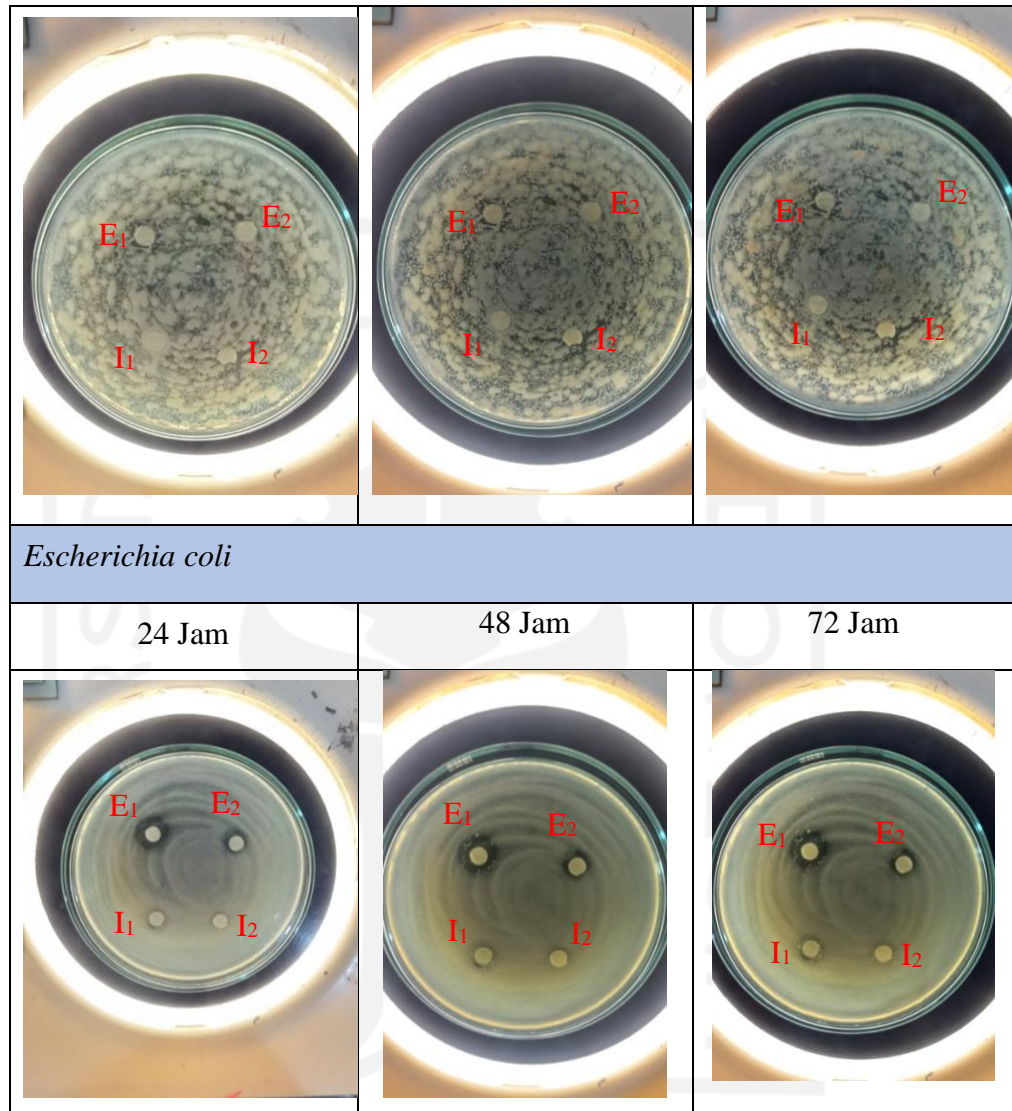
Posisi BACTEC 960 sebelum inkubasi



Hasil akhir analisis (setelah inkubasi)

k. Uji Aktivitas metode Difusi cakram

<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
24 Jam	48 Jam	72 Jam
		
<i>Streptococcus pyogenes</i>		
24 Jam	48 Jam	72 Jam
		
<i>Staphylococcus aureus</i>		
24 Jam	48 Jam	72 Jam



Keterangan:

E₁ = Ekstrak Ea 1000 ppm

E₂ = Ekstrak Ea 2500 ppm

I₁ = Isolat Ea 1000 ppm

I₂ = Isolat Ea 1000 ppm