

**KARAKTERISASI SENYAWA KATEKIN DARI DAUN TEH
HIJAU (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) 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:

**DWI ANGGRAENI SUKAESIH
No. Mhs : 17612090**

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

2021

PERSEMBAHAN

Alhamdulillah, bersyukur kepada Allah SWT atas nikmat dan kekuatan yang telah diberikan, sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan sebaik-baiknya.

Skripsi ini saya persembahkan untuk Keluarga Tercinta (Bapak Berman, Ibu Sri, Kakak Yoga, Adik Darma, yang tiada hentinya memberikan do'a, semangat, nasihat dan dukungan, baik secara moral maupun material. Saya persembahkan Skripsi ini untuk Bapak Dr. Habibi Hidayat S.Pd., M.Si. dan Ibu Dr. Nova Dilla Yanthi, M.S. selaku pembimbing tugas akhir yang telah memberikan ilmu, bimbingan dan arahan dalam segala proses penelitian sampai tersusunnya skripsi ini.

Untuk teman tercinta Eva Fadilah, yang telah menemani dan membantu selama awal perkuliahan hingga akhir kuliah ini. Terimakasih telah memberikan semangat, menuntunku dalam banyak hal dan mampu bertahan dalam segala proses penelitian sampai karya ini tercapai.

MOTTO

“Dan barangsiapa menaruh seluruh kepercayaannya kepada Allah, maka Allah akan mencukupkan keperluannya.”. [Ath-Thalaq/65 : 3].

“Untuk mencapai hal-hal besar, kita bukan hanya harus bertindak, tetapi juga bermimpi, bukan hanya rencana, tetapi percaya” (Anatole France)

“Pertama kita membentuk kebiasaan dan kebiasaan akan membentuk kita. Kalahkan kebiasaan burukmu, atau kebiasaan buruk itu akan mengalahkanmu” (Dr. Rob Gilbert)

“Jika belum bisa melakukan sesuatu yang besar, jangan mengutuk diri untuk tidak melakukan apapun”

KARAKTERISASI SENYAWA KATEKIN DARI DAUN TEH HIJAU (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) DAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI

SKRIPSI

oleh:

DWI ANGGRAENI SUKAESIH

No Mahasiswa: 17612090

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

Tanggal : 11 April 2022

Dewan Penguji

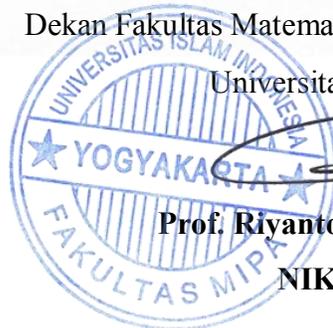
Tanda Tangan

1. Dr. Habibi Hidayat, M.Si (.....)
2. Dr. Nova Dilla Yanthi, M.Si (.....)
3. Amri Setyawati, M.Sc. (.....)
4. Wiyogo Prio Wicaksono, 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 TULISAN

Yang Bertanda tangan di bawah ini di bawah ini :

Nama : Dwi Anggraeni Sukaesih

NIM : 17612090

Program Studi : Kimia

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Dengan ini menyatakan bahwa skripsi saya dengan Judul Karakterisasi Senyawa Katekin dari Daun Teh Hijau (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) dan Uji Aktivitas Antibakteri bersifat asli dan tidak berisi material yang diterbitkan sebelumnya kecuali referensi yang disebutkan di dalam skripsi ini. Apabila terdapat kontribusi dari penulis lain, maka penulis tersebut secara eksplisit telah disebutkan dalam skripsi ini. Apabila di kemudian hari ditemukan ketidaksesuaian dengan pernyataan ini, maka saya bersedia dituntut dan diproses sesuai dengan ketentuan yang berlaku. Demikian pernyataan ini dibuat dengan sesungguhnya dan penuh tanggung jawab.

Yogyakarta, 12 April 2022



Dwi Anggraeni Sukaesih

KATA PENGANTAR

Assalamu 'alaikum warahmatullahi wabarakatuh.

Segala puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT atas rahmat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi ini. Shalawat dan Taslim penulis curahkan kepada Nabi Besar Muhammad SAW, yang telah menyingkap kegelapan wawasan umat manusia ke arah yang lebih beradab dan manusiawi.

Skripsi dengan judul “ ” ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana Kimia di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia.

Dalam penulisan skripsi ini, penulis mendapatkan bantuan dan dukungan dari banyak pihak, baik secara langsung maupun tidak langsung, berupa motivasi, pikiran, serta petunjuk-petunjuk sehingga skripsi ini dapat terselesaikan sebagaimana mestinya. Tak lupa saya ucapkan terimakasih kepada:

1. Orang tua tercinta, kakak saya dan seluruh keluarga yang senantiasa memberikan semangat, restu dan do'anya.
2. Bapak Fathul Wahid S.T., M.Sc., Ph.D. selaku Rektor Universitas Islam Indonesia.
3. Prof. Riyanto, S.Pd., M.Sc., Ph.D. selaku Dekan FMIPA Universitas Islam Indonesia.
4. Ibu 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, S.Si., M.Si. selaku Ketua Program Studi FMIPA Universitas Islam Indonesia.
6. Bapak Dr. Habibi Hidayat, S.Pd., M.Si. selaku dosen pembimbing 1 yang telah memberikan ilmu, masukan, arahan, saran dan persetujuan hingga skripsi ini dapat diselesaikan dengan baik.
7. Ibu Dr. Nova Dilla Yanthi, M.Si. selaku pembimbing 2 di Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI Cibinong yang telah memberikan arahan dan bimbingannya hingga

skripsi ini dapat diselesaikan dengan baik.

8. Seluruh staf dan dosen Program Studi FMIPA Universitas Islam Indonesia yang selama ini telah membantu dalam proses pembelajaran selama menjadi mahasiswa Kimia UII.

9. Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI Cibinong yang telah mendukung dalam sarana dan prasarana selama penelitian

10. Bapak Prof. Dr. Partomuan Simanjuntak, M.Sc. yang telah memberikan bimbingan dan ilmunya selama di Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI Cibinong.

11. Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset, dan Teknologi, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Riset, dan Teknologi, dan Direktorat Sumber Daya yang telah memberikan kesempatan sebagai penerima program Talenta Inovasi Indonesia kepada penulis dalam menunjang dana penelitian skripsi

12. Teman seperjuangan, Eva Fadilah, Ninda Yulia, Nur Madina, Tri Agustia dan seluruh anggota keluarga kimia angkatan 2017 yang telah memberikan semangat, menemani masa-masa perkuliahan, serta berbagi pengalaman berharga yang tak terlupakan

Penulis menyadari masih banyak kekurangan dalam penyusunan skripsi ini, oleh karena itu penulis menerima saran dan kritik dari pembaca agar dapat memperbaiki skripsi ini. Akhir kata semoga skripsi ini dapat membantu dan memberi wawasan serta manfaat bagi pembaca.

Wassalamu'alaikum warahmatullahi wabarakatuh.

Yogyakarta, 5 Desember 2021



Dwi Anggraeni Sukaesih

KARAKTERISASI SENYAWA KATEKIN DARI DAUN TEH HIJAU (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) DAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI

INTISARI

DWI ANGGRAENI SUKAESIH

NIM: 17612090

Infeksi Saluran Pernapasan Akut (ISPA) dan tuberkulosis merupakan penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri. Bakteri dapat menginfeksi saluran pernapasan karena bakteri terhirup masuk ke saluran pernapasan yang ditularkan melalui udara atau droplet. Pengobatan penyakit ISPA dan tuberkulosis dapat dilakukan dengan penggunaan antibiotik yang semakin lama dapat menimbulkan resistensi dan efek samping. Efek samping dari penggunaan antibiotik dapat diatasi dengan menggunakan pengobatan secara alami menggunakan daun teh hijau. Daun teh hijau mengandung senyawa aktif yang dapat dimanfaatkan sebagai antibakteri alami karena di dalamnya terdapat senyawa katekin. Senyawa katekin merupakan flavonoid yang termasuk golongan flavonol. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan isolasi dan karakterisasi senyawa katekin dari daun teh hijau serta uji aktivitas antibakteri. Proses isolasi katekin dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol, etil asetat, dan air dalam waktu 30 dan 60 menit. Ekstrak etanol dengan kadar katekin terbesar difraksinasi dengan metode kolom dan dimonitoring dengan KLT. Hasil isolat dikarakterisasi menggunakan FTIR dan HPLC serta dilakukan uji kepekaan menggunakan BACTEC MGIT 960 dan uji aktivitas antibakteri dengan metode kertas cakram. Hasil isolat positif mengandung katekin dengan reagen FeCl_3 dan didukung hasil FTIR dengan adanya gugus fungsi O-H, C=C, C-O, C-H aromatik yang merupakan karakteristik katekin. Analisis kadar katekin dengan HPLC terhadap isolat pada konsentrasi 2500 ppm dan 5000 ppm masing-masing sebesar 129,99 ppm (5,2%) dan 451,17 ppm (9,02%). Uji kepekaan terhadap *Mycobacterium tuberculosis* diperoleh hasil resisten, sedangkan uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, dan *E. coli* menghasilkan zona hambat tertinggi berturut-turut sebesar 21 mm, 22 mm, 21 mm dan 14 mm. Hasil ini menunjukkan kemampuan isolat dan ekstrak teh hijau sebagai antibakteri karena didapatkan zona hambat yang kuat terutama pada bakteri *S. aureus* yaitu sebesar 22 mm.

Kata Kunci: Teh Hijau, Katekin, antibakteri, ISPA, Tuberkulosis

CHARACTERIZATION OF CATECHIN FROM GREEN TEA LEAF (*CAMELLIA SINENSIS* (L.) KUNTZE) AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY TESTS

ABSTRACT

DWI ANGGRAENI SUKAESIH

NIM: 17612090

Acute Respiratory Infections (ARI) and tuberculosis are infectious diseases caused by bacteria. Bacteria can infect the respiratory tract because the bacteria are inhaled into the respiratory tract which is transmitted through the air or droplets. Treatment of ARI and tuberculosis can be done with the use of antibiotics which can cause resistance and side effects for a long time. The side effects of using antibiotics can be overcome by using natural remedies using green tea leaves. Green tea leaves contain active compounds that can be used as natural antibacterials because they contain catechin compounds. Catechins are flavonoids belonging to the flavonol group. This study aims to isolate and characterize catechin compounds from green tea leaves and test their antibacterial activity. The catechin isolation process was carried out by maceration method using ethanol, ethyl acetate, and water as solvents within 30 and 60 minutes. The ethanol extract with the highest catechin content was fractionated by column method and monitored by TLC. The isolates were characterized using FTIR and HPLC and were tested for sensitivity using BACTEC MGIT 960 and antibacterial activity test using the paper disc method. The positive isolate results contained catechins with FeCl₃ reagent and supported by FTIR results in the presence of O-H, C=C, C-O, C-H aromatic functional groups which are characteristic of catechins. Analysis of catechin levels by HPLC on isolates at concentrations of 2500 ppm and 5000 ppm were 129.99 ppm (10.39%) and 451.17 ppm (9.02%, respectively). The sensitivity test to *Mycobacterium tuberculosis* was resistant, while the antibacterial activity test against *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, and *E. coli* bacteria produced the highest inhibition zones of 21 mm, 22 mm, 21 mm and 14 mm, respectively. These results indicate the ability of isolates and green tea extracts as antibacterial because a strong inhibition zone, especially for *S. aureus* bacteria, is 22 mm.

Keywords: Green Tea, Catechins, Antibacterial, ARI, Tuberculosis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
PERSEMBAHAN DAN MOTTO.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
KATA PENGANTAR.....	v
INTISARI.....	vii
ABSTRACT.....	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
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
BAB III DASAR TEORI.....	9
3.1 Infeksi Saluran Pernapasan Akut (ISPA).....	9
3.2 Tuberkulosis.....	10
3.3 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	12
3.3 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	14
3.4 <i>Staphylococcus aureus</i>	16
3.5 <i>Streptococcus pyogenes</i>	17
3.6 <i>Escherichia coli</i>	19
3.7 Teh Hijau.....	20
3.7.1 Taksonomi Teh Hijau.....	21
3.7.2 Morfologi Teh Hijau.....	22
3.7.3 Manfaat.....	22
3.7.4 Kandungan Kimia.....	23
3.7.5 Katekin.....	23
3.7.6 Mekanisme Penghambatan Senyawa Aktif Teh Hijau terhadap Bakteri.....	24
3.8 Ekstraksi.....	25
3.9 Identifikasi Senyawa Aktif pada Teh Hijau.....	26
3.9.1 Spektrofotometer UV-Visible.....	26
3.9.2 <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> (FTIR).....	28
3.9.3 <i>High Performance Liquid Chromatography</i> (HPLC).....	30
3.10.1 Metode Kertas Cakram.....	32

3.10.2 Metode BACTEC MGIT 960	33
BAB IV METODE PENELITIAN	36
4.1 ALAT	36
4.2 BAHAN	36
4.3 CARA KERJA	37
4.3.1 Ekstraksi Teh Hijau dengan Metode Maserasi	37
4.3.2 Identifikasi Ekstrak Katekin dengan Reagen Kimia	37
4.3.3 Penentuan Kadar Senyawa Katekin dalam Ekstrak dengan Spektrofotometer UV-Vis	37
4.3.4 Optimasi fase gerak kromatografi kolom dengan KLT	38
4.3.5 Fraksinasi dengan Metode Kromatografi Kolom	38
4.3.6 Pemisahan dan Identifikasi dengan KLT Analitik	39
4.3.7 Identifikasi Gugus Fungsi dengan FTIR	39
4.3.8 Identifikasi Kadar Katekin dengan HPLC	39
4.3.9 Uji Kepekaan Senyawa Katekin terhadap <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	40
4.3.10 Uji Aktivitas Antibakteri terhadap <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> dan <i>Escherichia coli</i>	42
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN	44
5.1 Ekstraksi Teh Hijau dengan Metode Maserasi	44
5.2 Identifikasi Ekstrak dengan Reagen Kimia	46
5.3 Penentuan Kadar Senyawa Katekin dalam Ekstrak dengan Spektrofotometer UV-Vis	47
5.4 Optimasi Fase Gerak Kolom dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	51
5.5 Isolasi Senyawa Katekin dengan Kromatografi Kolom dan Analisis KLT	53
5.6 Identifikasi Gugus Fungsi dengan FTIR	58
5.7 Analisis katekin dengan HPLC	59
5.8 Uji Kepekaan <i>Mycobacterium tuberculosis</i> terhadap Antibakteri Teh Hijau dan Obat Antituberkulosis	60
5.9 Uji Aktivitas Teh Hijau terhadap Bakteri Patogen	63
5.10 Perbandingan Hasil Uji Aktivitas Antibakteri terhadap <i>M. tuberculosis</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. pyogenes</i> , dan <i>E. coli</i>	69
BAB VI KESIMPULAN	71
6.1 Kesimpulan	71
6.2 Saran	71
DAFTAR PUSTAKA	72
LAMPIRAN	77

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Penyebaran Bakteri TB	10
Gambar 2. (a) Bakteri <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ; (b) Penampakan <i>Mycobacterium tuberculosis</i> menggunakan Ziehl-Neelsen stain.....	13
Gambar 3. Bakteri <i>Klebsiella Pneumoniae</i> secara Mikroskopis pada Pengecatan Gram	15
Gambar 4. Gambaran Mikroskopis <i>S. aureus</i> (Perbesaran 1000x) dengan Pewarnaan Gram	16
Gambar 5. Bakteri <i>Streptococcus pyogenes</i>	18
Gambar 6. <i>Escherichia coli</i> Pembesaran 1000x	20
Gambar 7. Daun Teh Hijau.....	22
Gambar 8. Struktur Kimia Katekin dan Turunannya	24
Gambar 9. Prinsip Kerja Spektrofotometer UV-Vis	28
Gambar 10. Prinsip Kerja FTIR.....	29
Gambar 11. Skema instrumen HPLC	32
Gambar 12. Instrumen BACTEC MGIT 960	34
Gambar 13. Reaksi Perkiraan Katekin dengan FeCl_3	47
Gambar 14. Kurva Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Katekin	48
Gambar 15. Kurva Kalibrasi Standar Katekin dengan UV-Vis.....	49
Gambar 16. Hasil Identifikasi KLT dengan Eluen (A) N-Heksana : Etil Asetat (2:1); (B) Diklorometana : Metanol (5:1).....	52
Gambar 17. Kromatogram Fraksi Kolom Pertama	55
Gambar 18. Kromatogram Fraksi Kolom Kedua.....	57
Gambar 19. Hasil Analisis Katekin dengan FTIR	58
Gambar 20. Kurva Kalibrasi Standar Katekin.....	60

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Kelompok Obat Anti-TB	11
Tabel 2. Hasil Ekstrak Kering Teh Hijau	45
Tabel 3. Hasil Identifikasi Ekstrak dengan FeCl ₃	46
Tabel 4. Hasil Kadar Senyawa Katekin.....	50
Tabel 5. Interpretasi Spektra FTIR.....	59
Tabel 6. Hasil Uji Kepekaan MTB terhadap Obat Antituberkulosis	61
Tabel 8. Klasifikasi Respon Daya Hambat.....	65
Tabel 9. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Senyawa Katekin Teh Hijau	66

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit infeksi merupakan salah satu masalah serius dalam bidang kesehatan yang banyak terjadi di dunia. Di Indonesia, penyakit infeksi berkembang lebih cepat karena didukung oleh topografi Indonesia. Indonesia adalah negara tropis dengan kelembaban tinggi dan suhu yang rendah, sehingga dapat menyebabkan bakteri berkembang biak dengan cepat. Bakteri menjadi salah satu penyebab infeksi, baik bakteri Gram positif maupun bakteri Gram negatif (Ernyasih, 2012).

Bakteri infeksi dapat menyerang saluran pernapasan atas dan bawah yang biasa dikenal dengan Infeksi Saluran Pernapasan Akut (ISPA). Infeksi saluran pernapasan akut dan penyakit paru menjadi masalah kesehatan masyarakat dimana sekitar 3,5 juta kematian terjadi pada tahun 2019, sebelum munculnya virus korona. Pada tahun 2020, Penyakit ISPA, Tuberkulosis paru bersama kanker paru dan penyakit paru kronik merupakan empat dari sepuluh penyebab kematian tertinggi di dunia (Proyeksi Global dari Harvard & WHO, 2020). Tuberkulosis, ISPA dan bronkitis juga menjadi tiga penyebab kematian utama di Indonesia (WHS, 2013).

ISPA merupakan penyakit yang menyerang salah satu bagian atau lebih saluran pernapasan mulai dari hidung sampai alveoli termasuk adneksanya (sinus, rongga telinga tengah, dan pleura). Dilaporkan oleh Pujiani & Siwiendrayanti (2017) bahwa agen infeksius penyebab terjadinya infeksi saluran pernapasan akut adalah bakteri dan virus. Beberapa bakteri penyebab ISPA yang secara umum berada di saluran pernapasan bagian atas antara lain *Streptococcus pneumoniae* (*pneumococcus*), *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, dan *Staphylococcus aureus* (Aremu, et al., 2021). Selain itu, dapat juga disebabkan oleh *Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Bordetella pertussis* dan *Bacillus anthracis* (Yang, 2014). *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *chlamydia trachomatis*, *chlamydia pneumoniae*, *mycoplasma pneumoniae* (Agustina, dkk., 2019; Maharani, 2020).

Tuberkulosis (TB) adalah penyakit menular yang disebarkan melalui

partikel aerosol yang mengandung bakteri *Mycobacterium tuberculosis*, yaitu bakteri aerobik tahan asam (BTA). Penyakit ini menjadi penyebab kematian utama bagi penderita *Human immunodeficiency virus* (HIV) dan merupakan penyebab kematian pertama diantara penyakit infeksi. Dengan berkembangnya pandemi virus korona saat ini, memberikan dampak semakin sulitnya penurunan kasus TB dan diperkirakan jumlah angka kematian akibat TB meningkat sekitar 0,2–0,4 juta di tahun 2020. Berdasarkan *Global Tuberculosis Report* (2020), terdapat sekitar sepuluh juta orang di dunia terinfeksi tuberkulosis dan 1,4 juta orang diantaranya meninggal pada tahun 2019. Kasus TB terbesar terjadi di Asia Tenggara dan Indonesia menempati posisi kedua.

Penanganan infeksi saluran pernapasan akut dan tuberkulosis dapat dilakukan dengan pemberian antibiotik. Antibiotik merupakan senyawa sintetik atau alami yang dapat menekan atau bahkan menghentikan proses biokimiawi pada organisme, khususnya dalam proses infeksi bakteri (Soleha, 2015). Penggunaan antibiotik yang benar dilakukan secara rasional, artinya pemberian antibiotik harus tepat indikasi, tepat penderita, tepat obat, tepat dosis dan mempertimbangkan efek samping obat. Namun kenyataannya, berdasarkan suatu penelitian kualitatif menunjukkan bahwa penggunaan antibiotik di berbagai rumah sakit di Indonesia ditemukan 30% sampai 80% tidak didasarkan pada indikasi. Intensitas yang relatif tinggi dalam penggunaan antibiotik yang tidak tepat indikasi ini, dapat menimbulkan berbagai permasalahan dan menjadi ancaman global bagi kesehatan terutama menimbulkan terjadinya resistensi bakteri terhadap antibiotik tertentu (Zeniusa, 2017).

Ketika terinfeksi bakteri yang telah resisten antibiotik, pengobatan menjadi lebih sulit dan lebih lama dengan lebih banyak efek samping. Penggunaan antibiotik dalam jangka waktu yang lama memiliki efek samping antara lain: diare, muntah, mual, kekebalan tubuh menurun, pembentukan batu ginjal, gangguan pembekuan darah, dan gangguan fungsi hati (Allo, 2016). Untuk mengurangi efek samping dari antibiotik sintetik dan terjadinya resistensi, perlu dilakukan penelitian terhadap senyawa yang berkhasiat sebagai antibakteri dengan aktivitas yang lebih baik

melalui pemanfaatan tanaman. Salah satu tanaman yang diketahui memiliki efek antibakteri adalah daun teh hijau (*Camellia sinensis* (L) Kuntze).

Terapi pencegahan dan pengobatan menggunakan bahan alami daun teh hijau semakin banyak diterapkan karena tanaman mudah didapat, murah, tidak toksik dan efek samping yang dihasilkan relatif lebih kecil. Daun teh hijau mengandung senyawa-senyawa antara lain: alkaloid, saponin, tanin, protein, asam amino dan polifenol yang meliputi: flavonol, flavanol, flavon, flavanon, isoflavon, antosianin. Diketahui bahwa efek antibakteri yang dimiliki oleh teh hijau disebabkan karena kandungan polifenol. Katekin merupakan senyawa flavonol utama, yang terutama terdiri dari turunan *epigallocatechin gallate* (EGCG), *epigallocatechin* (EGC), *epicatechin gallate* (ECG), dan *epicatechin* (EC) (Wolfram, 2007). Kandungan polifenol pada teh hijau inilah yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme, seperti *Helicobacter pylori*, *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, dan *Pseudomonas aeruginosa* (Araghizadeh, et al., 2013; Archana & Abraham, 2011).

Manfaat lain dalam senyawa katekin dari teh hijau, yaitu dapat mengatasi penyakit-penyakit modern, seperti aterosklerosis, kelebihan kolesterol, tumor, kanker, mencegah tekanan darah tinggi, anti jamur, membunuh virus-virus influenza serta antibakteri (Syah, 2006). Oleh karena itu, dalam penelitian ini dilakukan isolasi senyawa bioaktif katekin dari daun teh hijau sebagai antibakteri dan diuji aktivitasnya terhadap bakteri *Mycobacterium tuberculosis* menggunakan metode BACTEC MGIT 960 dan terhadap bakteri *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, dan *Escherichia coli* menggunakan metode difusi cakram. Proses identifikasi senyawa isolat yang dihasilkan dilakukan dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT), *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) dan *Fourier-Transform Infrared Spectroscopy* (FTIR).

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana hasil isolasi senyawa katekin dari daun teh hijau (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze)?
2. Bagaimana hasil karakterisasi senyawa katekin dalam daun teh hijau (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze)?
3. Bagaimana aktivitas antibakteri senyawa katekin terhadap *Mycobacterium tuberculosis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* dan *Escherichia coli* ?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui hasil isolasi senyawa katekin dari daun teh hijau (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze)
2. Mengetahui hasil karakterisasi senyawa katekin dalam daun teh hijau (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze)
3. Mengetahui aktivitas antibakteri senyawa katekin terhadap *Mycobacterium tuberculosis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* dan *Escherichia coli*

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi potensi kandungan katekin dalam daun teh hijau sebagai alternatif antibakteri alami melalui uji kepekaan dan uji aktivitas antibakteri sehingga dapat dikembangkan lebih lanjut dalam bidang farmasi dan kesehatan.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

Infeksi Saluran Pernapasan Akut (ISPA) adalah penyakit infeksi yang menyerang saluran pernapasan mulai dari saluran atas (hidung) hingga saluran bawah (alveoli) termasuk jaringan andeksanya, seperti sinus, rongga telinga tengah, dan pleura. Penyakit ini dapat disebabkan oleh beberapa bakteri penyebab infeksi. Bakteri penyebab ISPA menurut penelitian Susanty, dkk. (2020) adalah *Streptococcus pneumoniae* dan *Staphylococcus aureus*, sehingga dilakukan uji aktivitas antibakteri terhadap kedua bakteri tersebut menggunakan ekstrak kacang tujuh. Metode yang digunakan adalah metode difusi cakram dan hasil yang diperoleh menunjukkan aktivitas antibakteri ekstrak daun kacang tujuh helai terhadap bakteri *S. aureus* dan *S. pneumoniae* pada konsentrasi 250, 500 dan 750 mg/mL termasuk kategori resisten. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian kembali menggunakan tanaman antibakteri yang lebih efektif

Penyakit infeksi lain pada sistem pernapasan yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis* adalah Tuberkulosis. Pengobatan penyakit ini menggunakan terapi kombinasi obat anti-TB, namun pengobatan yang terlalu lama menyebabkan munculnya resistensi. Beberapa penelitian dilakukan sebagai upaya untuk menghasilkan obat alternatif baru. Berdasarkan analisis dengan pendekatan komputasi, dari berbagai golongan bahan alam, golongan flavonoid menunjukkan afinitas pengikatan terbaik dengan MTB dan menghambat aktivitas rasemisasi dengan mengganggu struktur yang diinduksi (Pawar, dkk., 2020). Penelitian tersebut diperkuat oleh penelitian Zhang et. al. (2014) mengenai identifikasi 100 produk alami yang berasal dari tumbuhan sebagai penghambat *Mycobacterium tuberculosis* dengan konsentrasi akhir masing-masing 200 μ L yang dideteksi dengan metode MG132 sebagai kontrol positif. Diperoleh hasil penelitian bahwa flavonoid menghambat aktivitas *Mycobacterium tuberculosis* hingga 65%.

Salah satu tanaman yang mudah ditemui dan mengandung senyawa flavonoid adalah teh hijau. Kandungan senyawa yang memberikan kontribusi terbesar terhadap kesehatan pada teh hijau yaitu senyawa flavonoid, khususnya

katekin. Katekin merupakan turunan flavonoid yang tergolong dalam flavanol. Katekin pada daun teh hijau telah terbukti memiliki aktivitas antibakteri. Telah dilakukan penelitian oleh Herwin dan Maryam (2017), yaitu menguji aktivitas antibakteri daun teh hijau dan jati belanda terhadap bakteri *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mutans*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella thypi*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Bacillus subtilis*. Metode yang digunakan adalah metode dilusi padat dengan konsentrasi 1 mg/mL. Hasil dari uji skrining aktivitas antibakteri menunjukkan bahwa ekstrak air teh hijau dan jati belanda pada konsentrasi 1 mg/mL dapat menghambat semua bakteri uji tersebut, sementara hasil uji aktivitas antibakteri secara KLT-Bioautografi diperoleh bahwa ekstrak air teh hijau dengan nilai Rf 0,02 aktif terhadap bakteri uji *Staphylococcus epidermidis*, sedangkan pada nilai Rf 0,81; 0,73 dan 0,49 aktif terhadap bakteri uji *Shigella dysenteriae*.

Berdasarkan penelitian Koresy, 2018 menunjukkan bahwa ekstrak teh hijau dapat menghambat pembentukan biofilm bakteri *Klebsiella pneumoniae* pada konsentrasi 17,5% dan 20%. Hal ini dapat ditandai dengan tidak terbentuknya cincin pada area *air fluid border* pada tabung menggunakan metode tabung. Penelitian tersebut didukung oleh penelitian lain yang menemukan bahwa daun kemangi dapat pula menghambat pertumbuhan bakteri *K. pneumoniae* pada konsentrasi minimal 14% (Henry, 2015). Perbedaan konsentrasi minimal pada masing-masing ekstrak dimungkinkan karena terdapat senyawa katekin ataupun polifenol yang kandungannya lebih besar dibandingkan pada daun teh hijau (Koresy, 2018).

Epigallocatechin gallate (EGCG) adalah senyawa utama dalam daun teh hijau yang merupakan senyawa turunan katekin. Hal tersebut memunculkan beberapa penelitian, salah satunya penelitian mengenai aktivitas anti-tuberkulosis kombinasi EGCG dan OAT lini pertama oleh Mirzautika, dkk. (2020), dimana aktivitasnya ditentukan dengan metode *broth dilution* menggunakan media *Middlebrook 7H9* pada konsentrasi 50, 100, 150, dan 200 ppm, kemudian diamati potensi OAT lini pertama sebelum dan setelah dikombinasikan dengan EGCG. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa kombinasi EGCG dan OAT lini

pertama meningkatkan aktivitas anti-tuberkulosis mencapai $\geq 90\%$ pada konsentrasi yang lebih rendah, yaitu rifampisin 0,5 ppm, isoniazid 0,25 ppm, pirazinamid 20 ppm, dan etambutol 2 ppm.

Telah dilakukan uji kepekaan obat anti-tuberkulosis (OAT) lini kedua menggunakan BACTEC MGIT 960 oleh Rukmiati (2012). Sebanyak 30 isolat MDR TB diuji sensitivitasnya terhadap OAT ofloksasin, amikasin, dan kanamisin. Hasil penelitian menunjukkan bakteri MDR TB 100% sensitif terhadap ofloxacin dan spesifisitasnya 75%, sedangkan untuk amikasin 96% sensitif dan 4% resisten dengan spesifisitasnya 100%. Sementara pada kanamisin sensitif 100% dengan spesifisitas 100%.

Katekin merupakan senyawa polifenol yang memiliki beberapa aktivitas biologi seperti antikanker, antiinflamasi, antialergi, antihipertensi, antioksidan dan sebagai agen antimikroba (Rahardiyani, 2019). Ediningsih dan Rahayuningsih (2019) melakukan penelitian yang bertujuan mengetahui proses ekstraksi, isolasi, karakterisasi dan menentukan aktivitas antioksidan senyawa katekin dari serbuk gambir. Hasil penelitian menunjukkan bahwa serbuk gambir yang diekstraksi menggunakan pelarut etanol 70% menghasilkan katekin yang lebih banyak (51,20 g) dibandingkan pelarut metanol 70% (40,35 g) maupun etil asetat (16,40 g). Analisis FTIR menunjukkan senyawa hasil isolasi memiliki gugus fungsi hidroksi (-OH), vibrasi C=C alkena, ikatan C-H, CH₂ dan C-O, sehingga senyawa tersebut diduga mempunyai struktur dasar senyawa katekin.

Menurut Sudjatini (2017), penentuan kadar katekin dalam teh hijau dapat menggunakan metode HPLC. Ekstraksi katekin dari daun teh hijau dalam penelitian ini menggunakan pelarut air, lalu ampas teh dari ekstraksi air diekstraksi kembali dengan etil asetat. Hasil ekstrak teh hijau kemudian ditentukan komponen katekinnya dengan metode HPLC. Hasil kromatogram ekstrak teh dibandingkan dengan waktu retensi EC standar. Berdasarkan tingkat polaritasnya, di dalam teh hijau terdapat turunan katekin yang utama yaitu epigalokatekin (EGC), epigalokatekin galat (EGCG), epikatekin (EC), dan epikatekin galat (ECG) yang muncul pada menit ke 4,6 (EGC), ke 7,8 (EGCG), ke 8,6 (EC), dan ke 18,89 (ECG) (Lin et. al., 1996). Setelah diketahui posisi masing-masing katekin tersebut,

kandungan katekin pada ekstrak teh dapat ditentukan. Analisis dengan HPLC ini menunjukkan total senyawa katekin yang diperoleh dari ekstraksi teh hijau menggunakan pelarut air dan etil asetat sebesar 27,73%, dengan komposisi EGC 14,74%, EGCG 1,73%, EC 8,35%, dan ECG 2,91% dari berat kering.

BAB III

DASAR TEORI

3.1 Infeksi Saluran Pernapasan Akut (ISPA)

Menurut WHO, Infeksi Saluran Pernapasan Akut (ISPA) adalah penyakit infeksi yang menyerang saluran pernapasan atas atau bawah yang dapat menimbulkan berbagai spektrum penyakit dari infeksi ringan sampai penyakit yang parah dan mematikan, tergantung dari patogen penyebabnya, faktor penjamu dan faktor lingkungan. Bagian saluran pernapasan yang diserang adalah satu atau lebih bagian, mulai dari hidung (saluran atas) hingga alveoli (saluran bawah) termasuk jaringan andeksanya, seperti sinus, rongga telinga tengah, dan pleura. ISPA termasuk golongan *Air Borne Disease* karena cara penularan penyakitnya melalui udara. Patogen akan masuk dan menginfeksi saluran pernafasan dan menyebabkan inflamasi (Lubis, dkk., 2019). Penyakit ini berlangsung selama 14 hari. Penyakit ISPA yang tergolong berat, jika masuk ke dalam jaringan paru-paru akan menyebabkan Pneumonia (Jalil, 2018).

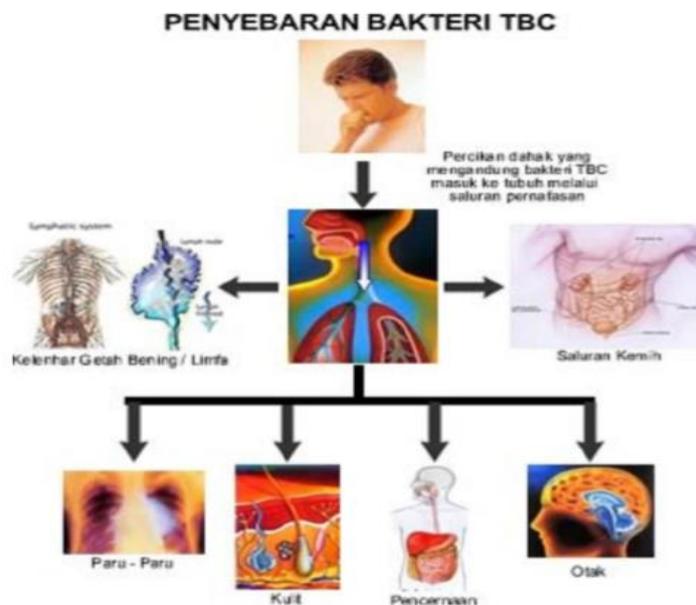
Penyebab penyakit ISPA antara lain bakteri, virus, jamur dan aspirasi. Bakteri penyebabnya adalah bakteri *Diplococcus pneumoniae*, *Pneumococcus*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, dan lain-lain. Penyebab lainnya adalah virus, diantaranya: *Influenza*, *Adenovirus*, *Cytomegalovirus*. Jamur penyebab ISPA antara lain *Aspergillus* sp., *Candida albicans*, *Histoplasma*, dan lain-lain. Selain disebabkan oleh bakteri, virus dan jamur, penyakit ini juga dapat disebabkan oleh aspirasi seperti makanan, asap kendaraan bermotor, bahan bakar minyak, cairan amnion pada saat lahir, benda asing (biji-bijian), dan lain-lain (Kunoli, 2013). Virus menjadi penyebab terbanyak infeksi saluran nafas akut (ISPA), diantaranya: rhinitis, sinusitis, faringitis, tonsilitis, dan laringitis. Hampir 90% dari infeksi tersebut disebabkan oleh virus dan hanya sebagian disebabkan oleh bakteri (Tandi, 2018).

Banyak faktor yang mempengaruhi terjadinya ISPA, antara lain: 1. kondisi lingkungan (polutan udara, misalnya asap rokok dan kendaraan, kepadatan anggota keluarga, kondisi ventilasi rumah, kelembaban udara, kebersihan, musim, dan

suhu), 2. ketersediaan, efektifitas pelayanan kesehatan serta pencegahan infeksi (vaksin, akses terhadap fasilitas pelayanan kesehatan, kapasitas ruang isolasi), 3. faktor penjamu (faktor usia, kebiasaan merokok, kemampuan penularan infeksi, status gizi, infeksi sebelumnya atau infeksi serentak yang disebabkan oleh patogen lain, kondisi kesehatan umum) dan 4. karakteristik patogen (cara penularan, daya tular, faktor virulensi, misalnya gen, dosis atau banyaknya mikroba) (Rosana, 2016).

3.2 Tuberkulosis

Tuberkulosis (TB) adalah penyakit menular langsung yang disebabkan oleh *M. tuberculosis*, 80% menyerang paru-paru. Selain menyerang paru-paru, penyakit ini juga menyerang bagian tubuh lain seperti kelenjar getah bening, selaput otak, kulit, tulang dan persendian, usus, ginjal dan organ tubuh lainnya (PPTI, 2010).



Gambar 1. Penyebaran Bakteri TB (Rostinawati, 2008)

Penyakit ini dapat menular melalui udara saat pasien TB batuk atau bersin dengan mengeluarkan percikan dahak (*droplet nuclei*) dan akan terhirup oleh orang lain saat bernapas. Percikan dahak yang mengandung kuman tersebut dapat bertahan selama beberapa jam di udara pada suhu kamar. Bakteri MTB yang terhirup melalui saluran pernapasan kemudian dapat menyebar dari paru-paru ke

bagian tubuh lainnya melalui sistem peredaran darah, sistem saluran limpa, saluran napas, ataupun dapat menyebar langsung ke bagian-bagian tubuh lainnya (Suryo, 2010).

Pengobatan TB diberikan dalam dua tahap, yaitu tahap intensif dan lanjutan. Pengobatan tahap intensif bertujuan untuk menurunkan jumlah bakteri yang berada dalam tubuh pasien dan meminimalisir adanya pengaruh dari bakteri resisten yang kemungkinan sudah ada sebelum terjadinya pengobatan. Lamanya waktu pengobatan pada tahap ini adalah 2 bulan (Kemenkes, 2014). Pengobatan pada tahap lanjutan merupakan tahap penting karena bertujuan untuk membunuh sisa-sisa bakteri MTB yang berada dalam keadaan *dormant* atau *persister* yang mungkin masih terdapat dalam tubuh pasien, sehingga pasien dapat sembuh total dan mencegah terjadinya kekambuhan (Kemenkes, 2014). Pasien diberi obat 3 kali seminggu dalam waktu 4 bulan (Amiruddin & Jaorana, 2009).

Dalam terapi pengobatan tuberkulosis, digunakan obat anti-tuberkulosis (OAT). OAT dikelompokkan dalam 5 kelompok berdasarkan bukti efikasi, potensi serta pengalaman penggunaannya, yaitu tertera pada Tabel 1 berikut (WHO, 2010):

Tabel 1. Kelompok Obat Anti-TB (Zumla, dkk., 2013)

Obat anti-TB lini pertama	<p>Kelompok 1</p> <p>Oral: isoniazid (INH/H), rifampisin (RIF/R), pirazinamid (PZA/Z), etambutol (EMB/E), rifapentin (RPT/P) atau rifabutin (RFB)</p>
Obat anti-TB lini kedua	<p>Kelompok 2</p> <p>Aminoglikosida injeksi: streptomisin (STM/S), kanamisin (Km), amikasin (Amk). Polipeptida injeksi: kapreomisin (Cm), viomisin (Vim)</p>
	<p>Kelompok 3</p> <p>Fluoroquinolon oral dan injeksi:</p>

	ciprofloksasin (Cfx), levofloksasin (Lfx), moxifloksasin (Mfx), ofloksasin (Ofx), gatifloksasin (Gfx)
	Kelompok 4 Oral: asam para-aminosalisilat (Pas), sikloserin (Dcs), terizidon (Trd), etionamid (Eto), protionamid (Pto),
Obat anti-TB lini ketiga	Kelompok 5 Clfazimin (Cfz), linezolid (Lzd), amoksisilin plus klavulanat (Amx/Clv), imipenem plus cilastatin (Ipm/Cln), klaritomisin (Clr).

3.3 *Mycobacterium tuberculosis*

Karakteristik bakteri *M. tuberculosis* ini berbentuk batang lurus atau melengkung, tidak berspora dan tidak berkapsul serta memiliki ukuran lebar 0,3 – 0,6 mm dan panjang 1 – 4 mm. *Mycobacterium tuberculosis* mempunyai dinding sel yang sangat kompleks, dimana penyusun utamanya adalah lapisan lemak sekitar 60%, yang khususnya terdiri dari asam mikolat. Asam mikolat merupakan asam lemak berantai panjang yang dihubungkan dengan arabinogalaktan oleh ikatan glikolipid dan peptidoglikan oleh jembatan fosfodiester. Selain itu, terdapat unsur lain yang menyusun dinding sel bakteri tersebut yaitu polisakarida. Dengan adanya dinding sel dengan struktur yang kompleks ini menyebabkan *Mycobacterium tuberculosis* bersifat tahan asam (BTA), yaitu sulit diwarnai dengan *Ziehl-Neelsen* dan akan tahan terhadap upaya penghilangan zat warna tersebut meskipun dengan larutan asam-alkohol (Perhimpunan Dokter Paru Indonesia, 2006; Murwani, 2017).

Bakteri ini juga memiliki ketahanan terhadap berbagai bahan kimia dan desinfektan seperti *phenol* 5%, asam sulfat 15%, asam sitrat 3% dan NaOH 4%, tetapi dapat dihancurkan dengan yodium tinctur dalam waktu 5 menit, sedangkan dengan alkohol 80% akan hancur dalam waktu 2-10 menit. Sementara itu, dari

beberapa penelitian bahan alami juga terbukti dapat menghambat pertumbuhan bakteri TB melalui terapi pengobatan (Yahya, 2012).

Klasifikasi bakteri *Mycobacterium tuberculosis* adalah sebagai berikut:

Kingdom: Bacteria

Filum: Actinobacteria

Ordo: Actinomycetales

Kelas: Actinomycetes

Family: Mycobacteriaceae

Genus: Mycobacterium

spesies: *Mycobacterium tuberculosis* (Murwani, 2017)



Gambar 2. (a) Bakteri *Mycobacterium tuberculosis*; (b) Penampakkan *Mycobacterium tuberculosis* menggunakan Ziehl-Neelsen stain (Velayati dan Parissa, 2016)

Tidak seperti bakteri lainnya, pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* relatif lambat, sehingga koloni akan tampak setelah kurang lebih 2 minggu bahkan hingga 6-8 minggu. Bakteri tahan asam ini biasa tumbuh pada medium padat seperti medium *Lowenstein-Jensen* pada pH optimum 6,4-7. Suhu optimum pertumbuhan bakteri adalah 37 °C dan pada suhu 25 °C atau ≥ 40 °C tidak akan tumbuh. Biakan *M. tuberculosis* dapat bertahan hidup selama 8-10 hari dalam percikan dahak, sementara pada suhu ruang dapat bertahan selama 6-8 bulan dan dapat disimpan dalam lemari pendingin selama 2 tahun pada suhu -20 °C (Yahya,

2012).

Bakteri *Mycobacterium tuberculosis* dapat hidup selama beberapa jam di tempat yang gelap dan lembab, tetapi akan mati jika terkena sinar matahari langsung. Apabila bakteri ini terdapat di dalam jaringan tubuh manusia, dapat tertidur selama beberapa tahun atau yang disebut dorman (Irianti, dkk., 2018). Mikroorganisme ini bersifat aerob, yaitu bakteri yang membutuhkan oksigen sehingga di dalam tubuh akan lebih senang berada di daerah apeks paru-paru yang kandungan oksigennya tinggi. Daerah tersebut menjadi kondusif untuk pertumbuhan bakteri tersebut (Somantri, 2007). Selain itu, *Mycobacterium tuberculosis* bersifat parasit intraseluler fakultatif, yaitu patogen yang dapat hidup dan membelah diri di dalam sel hospes maupun diluar sel hospes (sel fagositik), terutama makrofag dan monosit (Irianti, dkk., 2016).

3.3 *Klebsiella pneumoniae*

Taksonomi *Klebsiella pneumoniae* ditentukan pada tahun 1974 oleh Cowan, yaitu sebagai berikut (Barr, 1977) :

Kingdom: Bacteria

Filum: Proteobacteria

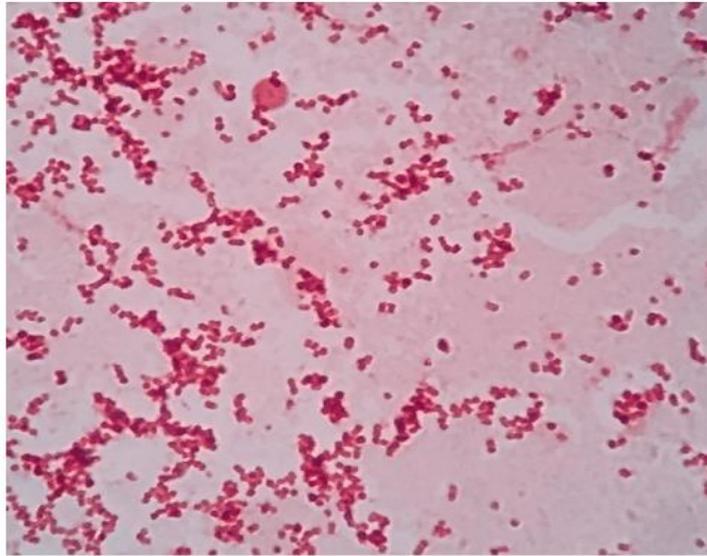
Kelas: Gammaproteobacteria

Ordo: Enterobacteriales

Family: Enterobacteriaceae

Genus: *Klebsiella*

Spesies: *Klebsiella pneumoniae*



Gambar 3. Bakteri *Klebsiella Pneumoniae* secara Mikroskopis pada Pengecatan Gram (Todar, 2012)

Klebsiella pneumoniae merupakan bakteri gram negatif dengan ciri-ciri memiliki kapsul, non motil, dan dapat memfermentasikan laktosa. Berdasarkan kebutuhan oksigen, bakteri ini dikelompokkan sebagai bakteri anaerob fakultatif (Efidasari, et al., 2013). Bakteri *K. pneumoniae* dapat tumbuh dalam kondisi aerob pada suhu 12-46 °C dengan pertumbuhan optimum saat suhu mencapai 35-37 °C dan tumbuh minimum di bawah kondisi anaerob. Sedangkan pH optimum pertumbuhannya adalah pH 7,2 (Rahmawati, 2009).

Morfologi dari *K. pneumoniae* terlihat berlendir (mukoid), berwarna merah muda dan memfermentasi laktosa pada media *Mac Conkey* agar (MCA). Saat berada pada media agar darah akan membentuk koloni mukoid, berwarna abu-abu sampai putih dan non hemolitik. Pada *Eosin Methylene Blue* (EMB) agar membentuk koloni mukoid, berwarna gelap dan non metalik. Isolasi bakteri pada agar *Simmons citrate* membentuk koloni berbentuk seperti kubah dengan warna kuning (Tanzila, 2018).

Bakteri *Klebsiella pneumoniae* mampu hidup dimana-mana. Bakteri ini juga dilaporkan diisolasi dari lingkungan seperti air permukaan, tanah dan peralatan medis. *Klebsiella pneumoniae* merupakan flora transien yang terdapat pada saluran nafas atas dan kulit. Beberapa penyakit yang disebabkan oleh bakteri ini antara lain:

pneumonia, infeksi saluran kemih, infeksi nosokomial, sepsis, meningitis serta abses hepar (Virawan, 2018). Selain itu, dapat menyebabkan infeksi lokal ataupun sistemik, dapat ditransmisikan melalui kateter, instrumen bedah, makanan dan susu. Bakteri dapat translokasi atau berpindah tempat sehingga dapat masuk ke peredaran darah (Wijaya, 2019; Veila, 2019).

Beberapa jenis *Klebsiella pneumoniae* dapat diobati dengan antibiotik, khususnya antibiotik yang mengandung cincin beta-laktam^{1,2}. Antibiotik tersebut antara lain: meropenem, kloramfenikol, siprofloksasin, dan ampisilin (Beesley, 1983).

3.4 *Staphylococcus aureus*

Sistem klasifikasi *Staphylococcus aureus* adalah sebagai berikut:

Divisi : Eubacteric

Subdivision : Firmicutes

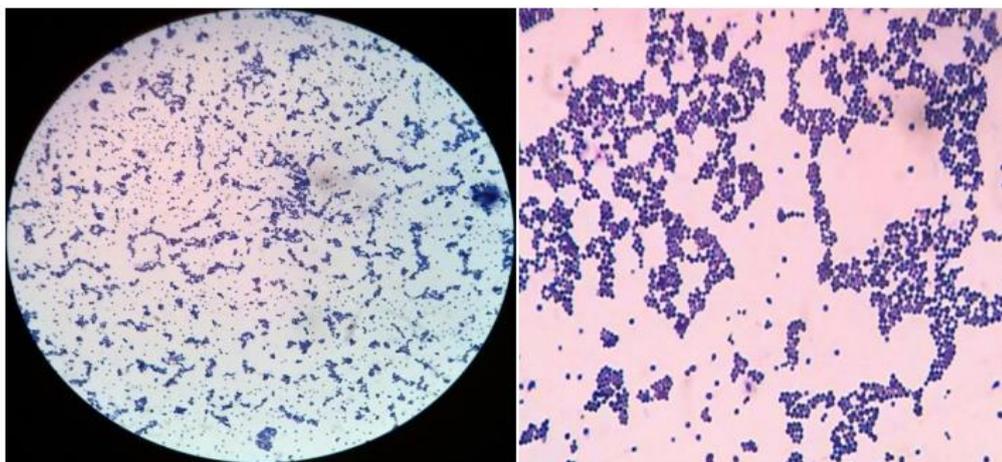
Class : Cocci

Ordo : Bacillales

Famili : Staphylococcaceae

Genus : Staphylococcus

Spesies : *Staphylococcus aureus* (Irianto, 2006).



Gambar 4. Gambaran Mikroskopis *S. aureus* (Perbesaran 1000x) dengan Pewarnaan Gram (Malelak, dkk., 2015)

Staphylococcus aureus adalah bakteri gram positif yang bersifat aerob fakultatif, menghasilkan pigmen kuning, tidak menghasilkan spora dan tidak motil. Ukuran diameter bakteri sekitar 0,8-1,0 μm . Bakteri ini tumbuh optimum pada suhu 37 °C dengan waktu pembelahan 0,47 jam (Jawetz, et al., 1996). *S. aureus* mudah ditemukan di udara, debu, limbah, air, susu, makanan atau peralatan makan dan di permukaan lingkungan (Wertheim, et al., 2008). Manusia dan hewan merupakan reservoir utama dengan tingkat 20-30% dari keseluruhan populasi sebagai pembawa *staphylococcus*.

Bentuk bakteri pada biakan cair terlihat dalam bentuk tunggal, berpasangan, berempat atau membentuk rantai. Akan tetapi, susunan yang paling khas adalah bergerombol. Pada biakan padat, koloni berbentuk bulat, halus menonjol dan berkilau-kilauan, serta membentuk berbagai pigmen (Jawetz, 1986).

Staphylococcus aureus merupakan patogen utama bagi manusia yang terdistribusi secara global. Bakteri ini dapat menyebabkan infeksi di bagian tubuh manapun (Simor & Loeb, 2009). Biasanya bakteri ini terdapat pada saluran pernafasan atas dan kulit. Beberapa penyakit infeksi yang dapat ditimbulkan akibat bakteri *S. aureus* adalah jerawat, bisul, impetigo dan infeksi luka (Welsh, et al., 2010). Infeksi lebih berat diantaranya: pneumonia, mastitis, meningitis, infeksi saluran kemih, osteomielitis dan endokarditis. Terjadinya infeksi serius tersebut saat keadaan inang melemah karena disebabkan adanya perubahan hormon, penyakit luka, atau perlakuan menggunakan steroid atau obat lain yang memengaruhi imunitas. Untuk mengatasi infeksi *S. aureus*, penderita umumnya diberikan terapi berupa antibiotik seperti cloxacillin, dicloxacillin dan eritromisin (Wikananda, dkk., 2019)

3.5 *Streptococcus pyogenes*

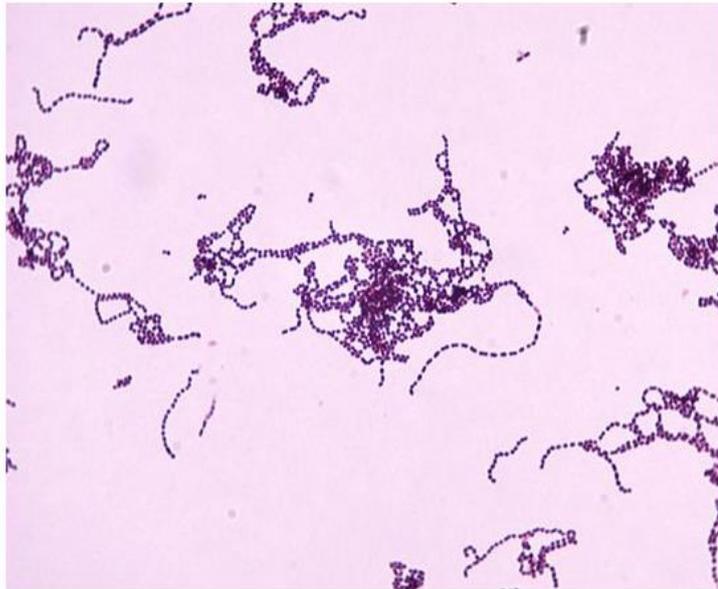
Taksonomi bakteri *Streptococcus pyogenes* menurut Soedarto (2015) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Bacteria

Filum : Firmicutes

Kelas : Bacili

Ordo : Lactobacillales
Famili : Streptococaceae
Genus : Streptococcus
Spesies : *Streptococcus pyogenes*



Gambar 5. Bakteri *Streptococcus pyogenes* (Donald, 2018)

Streptococcus pyogenes adalah jenis bakteri gram positif yang bersifat anaerob fakultatif, katalase-negatif, tidak motil, dan tidak memiliki spora. Bentuk bakteri ini adalah kokus dengan diameter 0.6-1.0 μm , tersusun berpasangan atau berderet seperti rantai dengan panjang yang bervariasi (Patterson, 2018).

Metabolisme dari *S. pyogenes* bersifat fermentatif dan pertumbuhannya membutuhkan media yang mengandung banyak darah. Pada media padat atau media cair, pertumbuhan bakteri ini cenderung lambat jika tidak ditambahkan dengan cairan jaringan atau cairan darah. *S. pyogenes* tumbuh optimum pada pH 7.4-7.6 dan suhu 37 °C (Mudatsir, 2010). Bakteri ini mempunyai kapsul yang mengandung asam hialuronat dan tergolong β -hemolisis karena dapat melisiskan eritrosit secara sempurna (Todar, 2012)

Streptococcus pyogenes merupakan bakteri patogen yang sering menginfeksi manusia. Diperkirakan 5-15% individu normal memiliki bakteri ini dan biasanya ditemukan pada saluran pernafasan, namun tidak menimbulkan gejala

penyakit. Infeksi bakteri terjadi ketika pertahanan tubuh seseorang menurun atau ketika organisme tersebut mampu berpenetrasi melewati pertahanan yang ada. Apabila penyebaran bakteri ini sampai ke jaringan yang rentan, maka infeksi supuratif dapat terjadi, seperti faringitis, tonsilitis, impetigo dan demam scarlet. Selain itu, *S. pyogenes* juga dapat menyebabkan penyakit invasif seperti infeksi tulang, *necrotizing fasciitis*, radang otot, meningitis dan endokarditis (Cunningham, 2000)

Infeksi bakteri *S. pyogenes* dapat diatasi dengan beberapa antibiotik golongan β -laktam, seperti penisilin, amoksilin dan sefalosporin generasi pertama. Jika terdapat efek samping berupa alergi pada penisilin, makrolida generasi baru juga dapat digunakan sebagai alternatif pilihan (Kim, 2015).

3.6 *Escherichia coli*

Menurut *Bergey's Manual of Systemic Biology*, taksonomi *Escherichia coli* diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom : Bacteria

Divisi : Proteobacteria

Kelas : Gamma Proteobacteria

Ordo : Enterobacteriales

Famili : Enterobacteriaceae

Genus : *Escherichia*

Spesies : *Escherichia coli*

E. coli merupakan bakteri gram negatif famili Enterobacteriaceae, berbentuk batang pendek (cocobasil) serta berukuran 0,4-0,7 μm x 1,4 μm . Beberapa strain memiliki kapsul dan tidak berspora, bersifat anaerob fakultatif, serta kebanyakan bersifat motil dengan menggunakan flagela. Umumnya dibutuhkan kelembaban yang cukup tinggi agar bakteri dapat yakni sekitar 85% (Madigan & Martinko, 2005). Bakteri ini termasuk golongan mesofilik, yaitu bakteri yang tumbuh optimum pada suhu 15-45 °C dan pH 5,5-8, sementara di atas suhu tersebut bakteri akan mengalami inaktivasi.



Gambar 6. *Escherichia coli* Pembesaran 1000x (Brooks, et al., 2013)

Escherichia coli merupakan bakteri flora normal yang hidup di saluran pencernaan manusia. Bakteri ini dapat bersifat patogen dan menyebabkan infeksi apabila terdapat di luar habitatnya dan saat daya tahan tubuh inangnya berkurang seperti pada saat kondisi kelelahan atau memiliki penyakit yang bersifat immunosupresan (Jang, et al., 2017; Waluyo, 2011). Secara klinis, *E. coli* sering menimbulkan infeksi pada saluran kemih, saluran empedu dan tempat-tempat lain di rongga perut (Octaviani, 2007). Infeksi lain yang disebabkan oleh bakteri ini adalah gastrointestinal dan infeksi ekstraintestinal (Riley, 2020). Pada paru-paru, bakteri ini menyebabkan infeksi pernapasan seperti pneumonia dan menjadi penyebab utama meningitis pada bayi (Castro, 2014).

Pengobatan terhadap infeksi bakteri *E. coli* dapat menggunakan antibiotik sulfonamida, ampicilin, sefalosporin, kloramfenikol, tetrasiklin dan aminoglikosida. Antibiotik ampicilin paling sering digunakan dalam pengobatan.

3.7 Teh Hijau

Tanaman teh berasal dari negara China dan selama ribuan tahun lamanya, teh telah terbukti memberikan efek yang baik terhadap kesehatan. Salah satu jenis teh yang diketahui adalah teh hijau yang berasal dari tanaman *Camellia sinensis* L. (Reygaert, 2014).

Teh hijau adalah pucuk dari daun muda pada tanaman teh yang diolah tanpa melalui proses fermentasi khusus, bertujuan untuk mempertahankan senyawa yang terkandung di dalam daun teh segar yang baru dipetik. Kandungan yang berpotensi sebagai antibakteri adalah substansi fenol atau polifenol (katekin, tannin, flavonoid) dan substansi bukan fenol (alkaloid dan flour) yang mampu menghambat atau membunuh bakteri (Herwin, 2018).

Teh dapat diklasifikasikan dengan melihat warna daunnya ataupun presentase oksidasi selama pemrosesan, namun semua jenis teh dihasilkan dari tanaman yang sama yaitu dari daun teh segar (*Camellia sinensis* L). Secara garis besar, teh terdiri atas teh tanpa fermentasi (teh putih dan teh hijau), teh semi fermentasi (teh oolong), dan teh terfermentasi (teh hitam). Perbedaan pada ketiganya terletak pada cara pemrosesan setelah daun teh dipetik. Semakin lama proses fermentasi yang dilakukan, maka warna daun yang hijau akan berubah menjadi cokelat dan pada akhirnya menjadi kehitaman (Sundari et. al., 2009). Sementara itu, juga menimbulkan perbedaan di dalam kandungan zat aktifnya terutama polifenol. Daun teh hijau memiliki kandungan polifenol tertinggi dibandingkan teh oolong dan teh hitam (Widyaningrum, 2013).

3.7.1 Taksonomi Teh Hijau

Secara taksonomi, tanaman teh hijau menurut Mahmood, dkk. (2017) diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom: Plantae

Superdivisi: Spermatophyta

Divisi: Magnoliophyta

Kelas: Magnoliopsida

Subkelas: Dilleniidae

Ordo: Tehales

Familia: Tehaceae

Genus: *Camellia*

Spesies: *Camellia sinensis* L.

3.7.2 Morfologi Teh Hijau

Tanaman teh merupakan famili dari *Tehacea*. Tanaman ini mampu tumbuh setinggi 10-15 m di alam liar dan 0,6-1,5 m pada tanaman budidaya (Ross, 2005). Tanaman ini merupakan jenis tumbuhan perdu yang memiliki akar tunggang kuat. Panjang daun teh hijau 4-15 cm, sedangkan lebarnya 2-5 cm. Daun muda yang bewarna hijau muda dan memiliki rambut-rambut pendek putih di bagian bawah daun, lebih disukai untuk produksi teh dari pada daun tua yang berwarna lebih gelap. Perbedaan umur daun akan mempengaruhi hasil kualitas teh berbeda-beda karena komposisi kimianya menjadi berbeda. Bagian dari daun teh yang dipanen untuk diproses menjadi teh adalah pucuk dan 2 hingga 3 daun pertama (Putra, 2015).



Gambar 7. Daun Teh Hijau

Daerah pantai hingga pegunungan dapat ditumbuhi oleh tanaman teh. Akan tetapi, teh hijau yang tumbuh di daerah dataran rendah cenderung memiliki hasil mutu yang kurang baik, sedangkan daerah dataran tinggi dapat meningkatkan mutu teh hijau. Tanaman teh memerlukan kelembaban tinggi dengan temperatur 13-29,5 °C (Soraya, 2007).

3.7.3 Manfaat

Teh hijau memiliki banyak manfaat untuk merawat kesehatan dan kecantikan. Contohnya Di China dan *Ayurvedic*, teh hijau dimanfaatkan sebagai stimulan, diuretik, dan untuk kesehatan jantung (Ogle, 2009). Manfaat lain teh hijau adalah mampu menurunkan berat badan dan melawan efek radikal bebas, mengatasi

sakit kepala, penyubur dan menghitamkan rambut, diabetes mellitus, mengurangi terbentuknya karang gigi, infeksi saluran cerna dan diare (Dalimartha, 1999). Beberapa penelitian terbaru menyatakan bahwa teh hijau dapat meningkatkan kekebalan tubuh, menurunkan kolesterol, sebagai antikanker, dan antibakteri.

Sifat antibakterial teh hijau efektif menghambat pertumbuhan beberapa bakteri seperti: *Staphylococcus aureus*, *Oral streptococci* (karies gigi), *Mycobacterium tuberculosis (tuberculosis)*, *Legionella pneumophila* (pneumonia), *Helicobacter pylori* (masalah pencernaan), *Bacillus cereus* (keracunan makanan), *Escherichia coli* (diare dan masalah ginjal), *Candida albicans* (candidiasis), dan *Chlamydia trachomatis (clamidia)* (Tran, 2013). Teh hijau bernilai tinggi apabila dimanfaatkan sebagai obat dan dikonsumsi dalam berbagai produk, seperti dalam minuman, makanan, atau dalam kapsul terkonsentrasi (Tran, 2013).

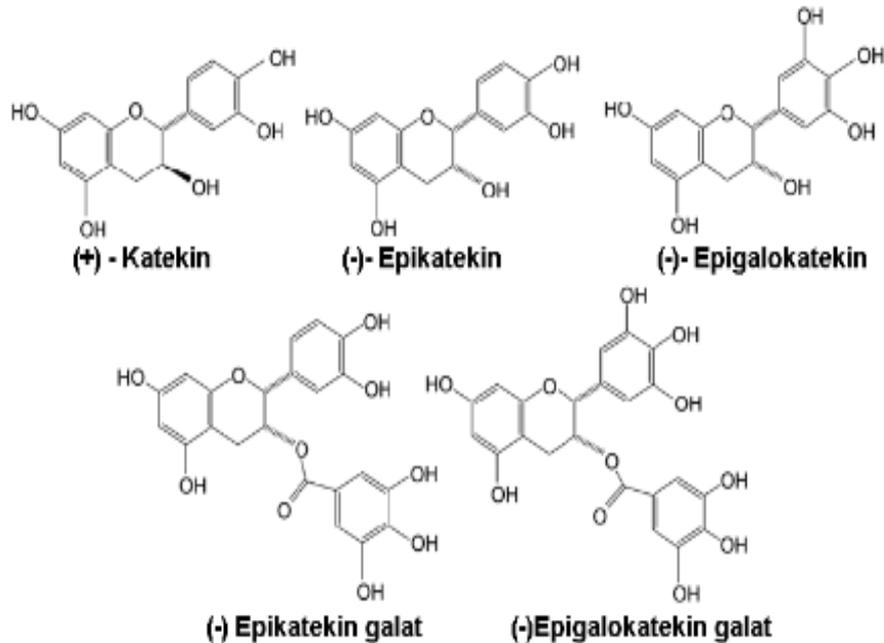
3.7.4 Kandungan Kimia

Kandungan senyawa di dalam daun teh hijau dapat digolongkan menjadi empat substansi, yaitu substansi fenol, bukan fenol, penyebab aroma dan enzim. Yang tergolong substansi fenol adalah polifenol dan flavanol, meliputi: senyawa kaemferol, kuarsetin, dan mirisetin (Alamsyah, 2006). Substansi bukan fenol meliputi alkaloid, karbohidrat, protein, pektin klorofil dan zat warna lain, asam organik, asam-asam amino, resin, vitamin-vitamin, dan mineral. Enzim-enzim meliputi invertase, amilase, β -glukosidase, oksimetilase, protease, dan peroksidase terkandung dalam teh hijau (Towaha *et. al.*, 2013). Menurut Sundari *et. al.* (2009), kafein, tanin dan polifenol merupakan tiga komponen utama yang mempengaruhi mutu dari teh hijau.

3.7.5 Katekin

Katekin merupakan golongan flavanoid yang masuk dalam kelas flavanol. Sifat katekin antara lain tidak berwarna, larut air, serta memiliki rasa pahit dan sepat (Hartoyo, 2008). Katekin mempunyai titik didih 245 °C dan titik leleh 104-108 °C. Katekin sensitif terhadap cahaya dan oksigen sehingga apabila kontak langsung dengan udara terbuka akan mengalami perubahan warna. Kelarutan katekin baik dalam air hangat dan stabil dalam kondisi agak asam atau netral (pH optimum 4-8)

(Syah, 2006). Adapun katekin di dalam teh memiliki komponen atau turunan utama, yaitu *epicatechin* (EC), *epicatechin gallate* (ECG), *epigallocatechin* (EGC), dan *epigallocatechin gallate* (EGCG).



Gambar 8. Struktur Kimia Katekin dan Turunannya (Cheong et. al., 2005)

Urutan kandungan turunan katekin dari kadar tertinggi, yaitu dimana EGCG, besarnya mencapai sekitar 59% dari total katekin, disusul EGC sekitar 19%, ECG 13,6% dan EC sebesar 6,4%. EGCG merupakan turunan katekin yang memiliki pengaruh paling besar terhadap aktivitas antibakteri. Dalam aktivitas antibakterinya, polaritas permukaan protein diubah oleh EGCG dan secara reversibel menghambat β -ketoasil (asil protein pembawa) reduktase dari bakteri, memodifikasi enzim protein diikuti oleh agregasi sehingga menyebabkan kematian bakteri (Li, dkk., 2006).

3.7.6 Mekanisme Penghambatan Senyawa Aktif Teh Hijau terhadap Bakteri

Mekanisme penghambatan dari senyawa katekin terhadap pertumbuhan bakteri yaitu melalui terjadinya kerusakan pada membran sel bakteri, penghambatan sintesis asam lemak, dan penghambatan aktivitas enzim. Ada juga beberapa efek yang dapat berkontribusi terhadap efek antimikroba total pada individu yang terinfeksi (Reygaert, 2014)

Kerentanan strain bakteri terhadap ekstrak teh telah dibuktikan oleh adanya pengaruh dari perbedaan komponen dinding sel. Dilaporkan bahwa aktivitas antibakteri dari ekstrak teh dapat disebabkan karena senyawa EGCG yang bermuatan negatif berikatan kuat pada *lipid bilayer* positif dari bakteri Gram-positif. Partisi katekin ke dalam membran *lipid bilayer* mengakibatkan hilangnya struktur dan fungsi sel sehingga sel mati. Selanjutnya, polifenol mengikat protein polimer poliamida terkait. Penghambatan mikroorganisme dapat juga disebabkan karena kurangnya zat besi atau kurangnya ikatan hidrogen dengan protein (Koech et. al., 2013).

3.8 Ekstraksi

Salah satu metode yang digunakan untuk pengambilan senyawa adalah ekstraksi. Ekstraksi merupakan proses pemisahan satu atau beberapa komponen dari suatu bahan padat atau cair dengan menggunakan pelarut sebagai *separating agent*. Teknik ini berguna untuk pemisahan baik senyawa organik maupun anorganik dan digunakan pula untuk analisis makro ataupun mikro. Adapun faktor-faktor yang mempengaruhi proses ekstraksi yaitu ukuran bahan baku, jumlah komponen senyawa dan distribusinya dalam padatan, sifat bahan, dan ukuran partikel (Sudjadi, 1998).

Ekstraksi bahan alam umumnya menggunakan ekstraksi padat-cair. Ekstraksi ini didasarkan pada prinsip perpindahan massa komponen zat ke dalam pelarut, dimulai dengan perpindahan pada lapisan antar muka lalu berdifusi masuk ke dalam pelarut (Depkes RI, 1995). Tujuan ekstraksi ini adalah untuk menyari atau memisahkan senyawa yang diinginkan dari bahan padat menggunakan pelarut yang sesuai. Untuk memperoleh hasil ekstrak yang baik, harus diketahui terlebih dahulu sifat senyawa yang akan diekstraksi terutama sifat kelarutannya. Kelarutan tersebut berhubungan dengan kepolaran, dimana senyawa yang polar akan larut dalam pelarut polar dan sebaliknya (Sowandi, 2016).

Proses Ekstraksi Bahan Alam meliputi proses pengeringan dan perajangan untuk mempertahankan kandungan kimia dalam penyimpanan yang lama, pemilihan Pelarut berdasarkan sifat kepolaran senyawa bahan alam, dan Pemilihan

Metode Ekstraksi yang disesuaikan berdasarkan bentuk/ tekstur bahan yang digunakan, kandungan air dari bahan yang diekstraksi, jenis senyawa yang akan diekstraksi dan sifat senyawa yang akan diekstraksi (Agoes, 2007).

Jenis-Jenis Metode Ekstraksi ada 2 macam, yaitu metode ekstraksi cara dingin (maserasi, perkolasi) dan metode ekstraksi cara panas (refluks, soxhlet). Maserasi merupakan metode penyarian yang sederhana dan banyak digunakan. Maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk tanaman dengan pelarut yang sesuai dalam wadah yang *inert* dan tertutup pada suhu ruang dan terlindung dari cahaya. Pelarut akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel tanaman yang mengandung zat aktif, dimana zat aktif tersebut akan larut karena perbedaan konsentrasi antara larutan di dalam sel yang lebih pekat dibandingkan larutan di luar sel, sehingga akan terdesak keluar. Proses tersebut dihentikan hingga tercapai keseimbangan konsentrasi antara larutan di dalam sel dan di luar sel.

Metode ini digunakan untuk mengekstrak bahan yang mengandung komponen kimia yang mudah larut dalam cairan penyari, tidak mengandung zat yang mudah mengembang seperti benzoin, styraks dan lilin. Penggunaan metode ini biasanya untuk sampel yang berupa daun (Ditjen POM, 2014).

Terdapat keuntungan dan kerugian dari metode maserasi. Adapun keuntungannya adalah peralatan dan cara kerjanya yang sederhana dan mudah dilakukan, tidak memerlukan pemanasan, serta tidak menyebabkan kerusakan (degradasi) metabolit yang tidak tahan panas karena dilakukan pada suhu ruang. Sementara kerugian dari metode ini adalah prosesnya membutuhkan waktu yang relatif lama, menghabiskan banyak pelarut dan penyarian kurang sempurna karena beberapa senyawa yang kurang larut pada suhu ruang tidak terekstraksi (Ditjen POM, 1986).

3.9 Identifikasi Senyawa Aktif pada Teh Hijau

3.9.1 Spektrofotometer UV-Visible

Spektrofotometer UV-Vis merupakan instrumen yang digunakan untuk mengukur energi apabila energi tersebut transmisikan, diemisikan, maupun direfleksikan sebagai fungsi dari panjang gelombang (Khopkar, 2003).

Spektrofotometer sinar tampak (*visible*) akan mengukur energi cahaya pada panjang gelombang tertentu. Rentang Panjang gelombang pada sinar ultraviolet adalah 200-400 nm, sedangkan sinar tampak (*visible*) berada pada panjang gelombang 400-750 nm.

Pengukuran panjang gelombang dan absorbansi analit menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis melibatkan energi elektronik yang cukup besar pada molekul yang dianalisis, sehingga instrumen ini lebih banyak dipakai untuk analisis kuantitatif dibandingkan dengan kualitatif. Analisis kuantitatif digunakan untuk menentukan konsentrasi dari analit di dalam suatu larutan dengan mengukur absorbansi pada panjang gelombang tertentu menggunakan Hukum *Lambert-Beer* (Day dan Underwood, 2002). Apabila cahaya diserap oleh suatu molekul akan direkam sebagai absorbansi. Berdasarkan Hukum *Lambert-Beer*, absorbansi pada suatu panjang gelombang tertentu didefinisikan sebagai :

$$A = \log I_0/I$$

A = Absorbansi

I_0 = Intensitas cahaya masuk

I = Intensitas cahaya keluar

Besarnya absorbansi suatu senyawa dipengaruhi dari pada panjang gelombang tertentu dan banyaknya molekul yang mengalami transisi. Oleh karena itu, absorbansi bergantung pada struktur elektronik suatu senyawa, kepekatan sampel dan panjang sel sampel. Besarnya absorpsi energi itu dinyatakan sebagai absorptivitas molar. Sehingga besarnya absorbansi dinyatakan dengan persamaan :

$$A = \epsilon b c \text{ atau } A = a b c$$

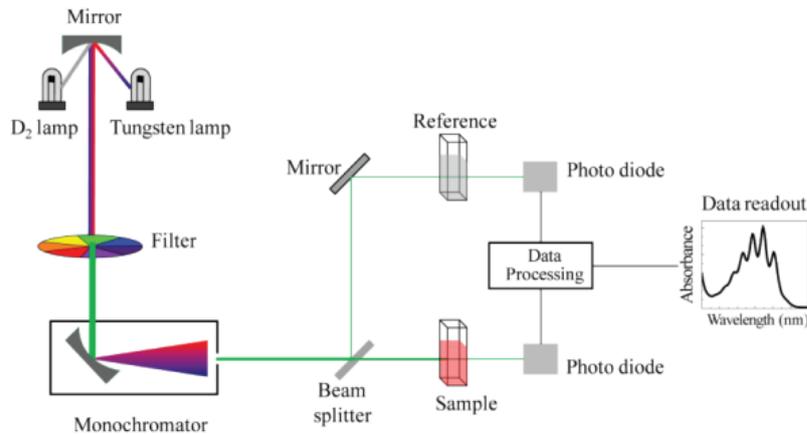
ϵ = Absorptivitas molar

A = Absorbansi

a = Absorptivitas (g/L)

b = Tebal Kuvet (cm)

c = Konsentrasi (mg/L) (Fessenden dan Fessenden, 1982)



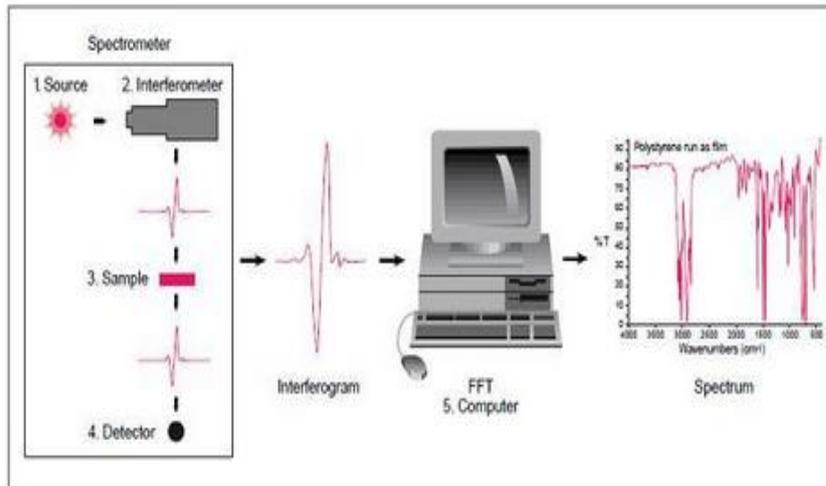
Gambar 9. Prinsip Kerja Spektrofotometer UV-Vis (Suharti, 2017)

3.9.2 *Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)*

FTIR merupakan metode mengukur interaksi antara molekul dengan radiasi elektromagnetik IR pada daerah bilangan gelombang $13.000\text{--}10\text{ cm}^{-1}$ atau panjang gelombang $0,75\text{--}1.000\text{ }\mu\text{m}$. Menurut Stuart (2004), spektra IR terbagi dalam 3 daerah utama, yaitu: IR jauh ($< 400\text{ cm}^{-1}$), IR tengah ($4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$), dan IR dekat ($13000\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$).

Daerah yang sering digunakan dalam karakterisasi senyawa kimia adalah daerah IR tengah, karena sebagian besar molekul kimia memiliki karakteristik dan vibrasi molekul utama pada daerah tersebut (Davis dan Mauer, 2010). Sementara daerah IR jauh digunakan untuk analisis senyawa organik, anorganik maupun organologam dengan massa atom lebih dari 19, sedangkan IR dekat digunakan pada analisis kuantitatif dengan kecepatan tinggi.

Prinsip kerja spektrofotometer inframerah adalah fotometri. Sumber sinar IR merupakan kombinasi dari variasi panjang gelombang. Sinar yang melalui interferometer akan difokuskan terhadap sampel. Sinar yang ditransmisikan oleh sampel uji akan difokuskan ke detektor. Perubahan intensitas sinar menghasilkan suatu gelombang interferensi. Gelombang interferensi akan diubah menjadi sinyal oleh detektor dan diperkuat oleh penguat, selanjutnya diubah menjadi sinyal digital.



Gambar 10. Prinsip Kerja FTIR

Mekanisme yang terjadi pada FTIR yaitu sinar datang dari sumber sinar IR lalu akan diteruskan dan akan dipecah oleh pemecah sinar menjadi dua bagian sinar yang saling tegak lurus. Sinar tersebut selanjutnya dipantulkan oleh dua cermin yaitu cermin diam dan cermin bergerak. Sinar hasil pantulan dari kedua cermin akan kembali dipantulkan ke arah pemecah sinar agar saling berinteraksi. Sinar yang terbagi dua, sebagian akan diarahkan menuju sampel dan sebagian menuju sumber. Gerakan cermin yang maju mundur menyebabkan sinar berfluktuasi pada detektor. Fluktuasi sinar sampai pada detektor ini akan menghasilkan sinyal pada detektor yang terdapat pada interferometer (Prastika, 2015).

Spektroskopi inframerah diaplikasikan untuk analisis kualitatif maupun kuantitatif dengan spektrum yang luas. Kegunaan yang paling penting dari spektroskopi inframerah adalah untuk identifikasi struktur molekul suatu senyawa organik dan menentukan gugus-gugus fungsi molekul (Mulja & Suharman, 1995), karena spektrumnya sangat unik dan kompleks serta terdiri dari banyak puncak-puncak (Chusnul, 2011). Apabila analisis dengan inframerah ini digabung dengan analisis NMR akan dapat digunakan untuk menentukan struktur suatu senyawa (Hayati, dkk., 2017).

Metode FTIR memiliki keunggulan dibandingkan metode spektroskopi inframerah konvensional maupun metode spektroskopi yang lain karena komponen utamanya adalah interferometer Michelson yang mempunyai fungsi menguraikan

(mendispersi) radiasi inframerah menjadi komponen-komponen frekuensi, diantaranya adalah informasi struktur molekul dapat diperoleh secara tepat dan akurat (memiliki resolusi yang tinggi), dapat digunakan untuk mengidentifikasi sampel dalam berbagai fase (gas, padat atau cair). Kesulitan dalam karakterisasi dengan spektroskopi FTIR dapat didukung oleh data yang diperoleh dari metode spektroskopi lain (Sankari, 2010). Keuntungan yang lain dari metode ini adalah menyediakan pilihan efektivitas yang lebih tinggi. Selain itu penggunaan instrument ini relatif cepat, sensitif, non destruktif, bebas pada preparasi sampel, serta menggunakan reagen kimia dan pelarut yang relatif sedikit (Blanco, 2007).

3.9.3 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Metode HPLC merupakan suatu metode kromatografi cair-cair yang digunakan untuk keperluan pemisahan maupun untuk analisis kuantitatif. Dalam analisis kuantitatif dengan metode ini didasarkan pada pengukuran luas atau area puncak analit dalam kromatogram, dibandingkan dengan luas atau area larutan standar. Pada praktiknya, metode perbandingan area standar dan sampel kurang menghasilkan data yang akurat bila hanya melibatkan satu standar, oleh karena itu harus dilakukan perbandingan dengan menggunakan teknik kurva kalibrasi (Cupritabu, 2010).

HPLC sering digunakan untuk menetapkan kadar senyawa aktif pada obat, produk hasil samping proses sintesis, atau produk- produk degradasi dalam sediaan farmasi (Cupritabu, 2010). Selain itu, digunakan pada pemisahan dan pemurnian senyawa tertentu dalam sampel pada berbagai bidang, seperti: farmasi, lingkungan, bioteknologi, polimer, dan industri-industri makanan. Kegunaan umum HPLC adalah untuk pemisahan sejumlah senyawa organik, anorganik, maupun senyawa biologis; analisis ketidakmurnian (impurities); analisis senyawa-senyawa mudah menguap (volatil); penentuan molekul-molekul netral, ionik, maupun *zwitter ion*; isolasi dan pemurnian senyawa; serta pemisahan senyawa-senyawa yang strukturnya hampir sama (Cupritabu, 2010).

Ada 2 cara pengelusan dalam HPLC yaitu elusi isokratik dan elusi gradien. Elusi isokratik merupakan elusi yang menggunakan pelarut tunggal atau campuran

beberapa pelarut dengan komposisi tetap, sedangkan pada elusi gradien menggunakan dua atau lebih pelarut dalam suatu sistem yang mempunyai perbedaan kepolaran yang signifikan (Skoog, 2004).

Komponen utama HPLC Menurut Adnan (1997) antara lain:

1. *Reservoir* pelarut

Variasi *reservoir* pelarut dalam HPLC, disesuaikan polaritasnya berdasarkan dari senyawa yang dianalisis.

2. Pompa

Pompa digunakan untuk mengalirkan fase gerak atau eluen dengan kecepatan dan tekanan konstan

3. Injektor

Berfungsi untuk menginjeksikan ke dalam kolom, agar pelarut tidak mengganggu masuknya sampel ke dalam kolom. Injeksi dapat menggunakan *syringe*.

4. Kolom

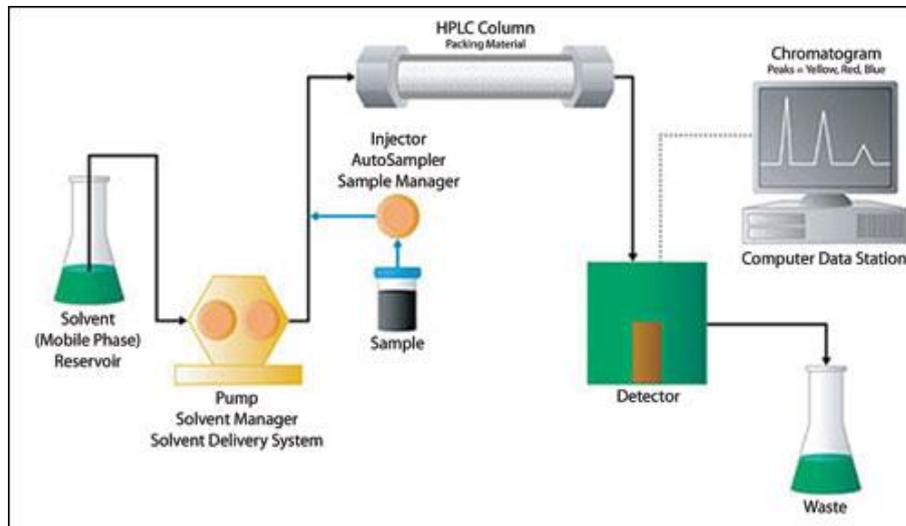
Ukuran kolom yang umum dipakai adalah dengan panjang 10-25 cm dan berdiameter 4,5-5 mm, yang diisi dengan fase stasioner berukuran rata-rata 5-10 mikrometer dan dibuat dari logam *stainless steel*.

5. Detektor

Detektor digunakan untuk mendeteksi suatu zat atau sampel. Sifat-sifat detektor yang diperlukan adalah mempunyai spesifitas tinggi, bersifat linear untuk jangka konsentrasi tertentu dan dapat mendeteksi eluen tanpa mempengaruhi resolusi kromatogram.

Prinsip kerja dari HPLC adalah dengan bantuan pompa fasa gerak cair dialirkan melalui kolom ke detektor, kemudian sampel dimasukkan ke dalam aliran fasa gerak dengan cara penyuntikan. Di dalam kolom, terjadi proses pemisahan komponen-komponen akibat adanya perbedaan kekuatan interaksi zat terlarut terhadap fasa diam. Senyawa yang kurang kuat interaksinya dengan fasa diam akan keluar lebih dulu dari kolom. Sebaliknya, senyawa memiliki interaksi kuat dengan fasa diam akan keluar lebih lama dari kolom dan dideteksi oleh detektor, lalu direkam dalam bentuk kromatogram. Jumlah peak yang dihasilkan menyatakan

konsentrasi komponen dalam campuran. Komputer berfungsi mengontrol kerja sistem HPLC serta mengolah data hasil pengukuran HPLC (Khopkar, 2003).



Gambar 11. Skema instrumen HPLC

Metode KCKT memiliki kelebihan antara lain: mampu memisahkan molekul-molekul dari suatu campuran, resolusinya baik, kecepatan analisis dan kepekaannya tinggi, dapat dihindari terjadinya dekomposisi/kerusakan bahan yang dianalisis, kolom dapat digunakan kembali, instrumennya memungkinkan untuk bekerja secara otomatis dan kuantitatif, ideal untuk analisis molekul besar dan ion, serta dapat dilakukan pada suhu kamar (Hayun, 2006).

Adapun kekurangan dari metode ini adalah larutan harus dicari fase diamnya terlebih dulu, hanya bisa digunakan untuk asam organik, harus mengetahui kombinasi yang optimum antara pelarut, analit, dan gradien elusi, serta harganya mahal sehingga penggunaannya dalam lingkup penelitian yang terbatas (Arindradita, 2009).

3.10 Metode Uji Aktivitas Antibakteri

3.10.1 Metode Kertas Cakram

Uji aktivitas antibakteri bertujuan untuk menentukan aktivitas suatu bahan dengan kadar tertentu yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Salah satu metode yang sering digunakan dalam uji aktivitas antibakteri adalah metode difusi kertas cakram. Penentuan daerah hambatan dilihat dari daerah yang tidak ditumbuhi

oleh bakteri. Luasnya zona hambat dipengaruhi oleh kemampuan daya resap bahan antibakteri ke dalam agar dan kepekaan bakteri terhadap bahan antibakteri tersebut (Misnadiarly & Djajaningrat, 2014).

Metode kertas cakram (*kirby bauer*) merupakan metode yang biasa digunakan untuk menguji aktivitas antibakteri suatu antibiotik terhadap mikroorganisme patogen penyebab penyakit. (Cappucino & Sherman, 2001). Parameter yang digunakan adalah zona bening, yaitu daerah bening di sekeliling kertas cakram sebagai indikasi tidak adanya atau terhambatnya pertumbuhan mikroorganisme karena adanya ekskresi zat antimikroba oleh kompetitornya (Byod, 1995; Atlas & Bartha, 1998). Adapun jumlah bakteri yang memenuhi syarat untuk uji kepekaan/sensitivitas yaitu 10⁵-10⁸ CFU/mL (Hermawan, dkk., 2007).

Pada metode kertas cakram, bahan yang digunakan adalah cakram kertas saring (*paper disc*) sebagai tempat menampung zat antibakteri. Prinsip kerja pada metode ini yaitu kertas saring diletakkan di atas lempeng agar yang telah diinokulasi bakteri uji dan dilakukan diinkubasi pada waktu dan suhu tertentu, sesuai dengan kondisi optimum dari bakteri uji. Umumnya hasil dapat diamati setelah proses inkubasi selama 18-24 jam dengan suhu 37 °C (Pelczar & Chan, 1988). Hasil zona hambat yang terbentuk ada 2 macam, yaitu *radical zone*, yakni suatu daerah di sekitar disk dimana sama sekali tidak ditemukan adanya pertumbuhan bakteri. Sementara *irradical zone* yaitu daerah di sekitar *disc* yang menunjukkan adanya hambatan terhadap pertumbuhan bakteri oleh antibakteri, tetapi tidak dimatikan (Ariyani, 2018).

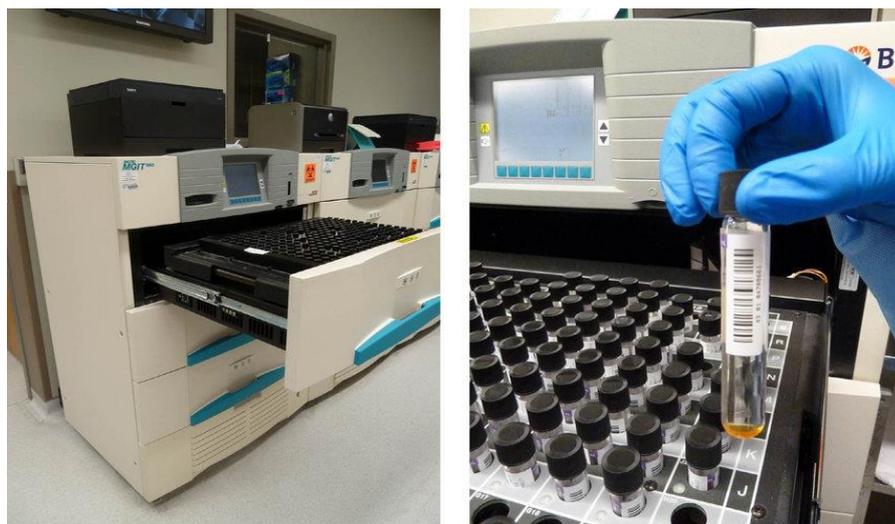
Terdapat kelebihan dan kekurangan dalam metode kertas cakram. Adapun kelebihanannya adalah mudah dilakukan, relatif murah dan tidak menggunakan peralatan khusus. Sementara kekurangannya adalah ukuran zona bening yang terbentuk tergantung dari kondisi inkubasi, predifusi dan preinkubasi, ketebalan medium, dan inoculum. Metode ini juga tidak dapat diaplikasikan pada mikroorganisme dengan pertumbuhan lambat dan bakteri anaerob obligat (Bonang, 1992).

3.10.2 Metode BACTEC MGIT 960

Instrumen BACTEC adalah metode pengujian kepekaan obat yang mengukur CO₂ yang dihasilkan oleh pemecahan metabolisme asam palmitat dalam medium cair *Middlebrook*. Metode BACTEC MGIT ada 2 macam, yaitu BACTEC MGIT 460 dan BACTEC MGIT 960.

BACTEC MGIT 460 merupakan metode semi-otomatis berbasis kaldu yang dapat mendeteksi mikrobakteri secara cepat dalam sistem tertutup. Kelebihan sistem ini adalah beberapa konsentrasi dapat diuji dan MIC dapat dihitung, hasil uji dapat diperoleh dalam 5 hari. Kelemahan dari sistem ini adalah mahal, tidak dapat digunakan untuk sejumlah besar senyawa dan menggunakan metode radiometrik untuk mendeteksi pertumbuhan mikrobakteri, sehingga penggunaan dan pembuangan limbah isotop (radioaktif) akan menimbulkan masalah logistik berbahaya (Huang, 2002; Sanchez & Kouznetsov, 2010).

BACTEC MGIT 960 merupakan sistem non-radiometrik yang dapat mendeteksi pertumbuhan mikrobakteri dari spesimen klinis dengan memanfaatkan media cair siap pakai dan sistem sensor fluoresen terlarut oksigen. Kelebihan dari sistem ini adalah akurat, sensitif, metode non-radiometrik, cepat untuk uji kepekaan MTB terhadap obat dan biakan media cair BACTEC MGIT 960 dapat dilakukan secara manual ataupun otomatis dengan BACTEC MGIT 960 (Huang, 2002; Setiarsih, 2012).



Gambar 12. Instrumen BACTEC MGIT 960

Uji kepekaan obat dengan MGIT 960 SIRE merupakan uji kualitatif selama 4-13 hari yang didasarkan pada pertumbuhan isolat MTB dalam tabung berisi obat dibandingkan dengan tabung tanpa obat (growth control, GC). Biakan menggunakan sistem BACTEC MGIT 960 adalah suatu cara diagnostik TB paru dengan menanam spesimen pada 7 mL media *Middlebrook 7H9 broth base* yang mengandung 110 uL indikator fluoresensi dengan tris 4,7 *diphenyl-1,10 phenanthroine ruthenium chloride pentahydrate* dalam basis karet silikon kemudian diinkubasi selama 4-8 minggu pada suhu 37 °C pada mesin yang dilengkapi dengan sensor fluoresens otomatis (setiarsih, 2012). Hasil biakan MGIT positif, jika sensor fluoresens pada tabung MGIT mendeteksi pertumbuhan >75 unit atau terdapat biomassa 10⁵-10⁶ CFU/mL medium berdasarkan penggunaan oksigen pada tabung, sedangkan hasil biakan MGIT negatif, jika sensor fluoresens tidak mendeteksi penggunaan oksigen pada tabung MGIT yang menandakan bahwa tidak adanya pertumbuhan *M. tuberculosis*.

BAB IV METODE PENELITIAN

4.1 ALAT

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: gelas ukur 1000 mL, gelas ukur 100 mL, erlenmeyer 500 mL, erlenmeyer 250 mL, gelas beaker 100 mL, gelas beaker 250 mL, dan 500 mL, labu ukur 100 mL, pipet ukur 10 mL, pipet ukur 5 mL, pipet ukur 1 mL, pipet tetes, tabung eppendorf 10 mL, kuvet, cawan petri, tabung reaksi, tabung MGIT 7 mL, rak AST, vial, plat KLT, *chamber*, spatula, pengaduk kaca, corong gelas, penggaris, termometer, *magnetic stirrer*, *syringe*, filter membran, mikropipet, jarum ose, spreader, bunsen, corong pisah, ayakan 40 *mesh*, pinset, neraca analitik, kompor listrik, *blender*, vortex, *shaker*, *rotary evaporator*, Oven, *autoclave*, inkubator, mikroskop, *Laminar Air Flow*, Kolom Kromatografi, lampu UV 254 nm, Spektrofotometer UV-Vis, *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), *Fourier-Transform Infrared Spectroscopy* (FTIR), dan Instrumen BACTEC MGIT 960.

4.2 BAHAN

Bahan yang digunakan dalam percobaan antara lain: serbuk daun teh hijau, air (H₂O), etanol (C₂H₅OH), metanol (CH₃OH), etil asetat (C₄H₈O₂), diklorometana (CH₂Cl₂), N-heksana (C₆H₁₄), FeCl₃, Serium Sulfat (Ce(SO₄)₂) 1%, H₂SO₄ 10%, plat KLT silika gel 60 F₂₅₄, silika gel G60, *celite*, standar katekin murni, asam asetat (CH₃COOH) 0,3%, asetonitril (C₂H₃N), NaCl, pelet KBr, MGIT SIRE suplemen, darah (domba), gliserol, bakteri *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, obat isoniazid, Streptomisin, antibiotik Ampisilin Eritomisin, media *nutrient broth* (NB), nutrien agar (NA), *Mueller Hinton Broth* (MHB), kertas saring, kapas, aluminium foil, tip, pipa kapiler, kapas, *plastic wrap*, kertas cakram,

4.3 CARA KERJA

4.3.1 Ekstraksi Teh Hijau dengan Metode Maserasi

Serbuk daun teh hijau ditimbang sebanyak 50 gram lalu dilarutkan dengan variasi pelarut etanol, etil asetat, dan air mendidih masing-masing sebanyak 750 mL dalam gelas beaker dan dimaserasi dengan variasi suhu 30 menit dan 60 menit sambil *distirer*. Larutan ekstrak kemudian disaring dengan kertas saring dan filtrat yang diperoleh dievaporasi untuk menguapkan pelarutnya dengan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kering (Ediningsih & Rahayuningsih, 2019); (Sudjatini, 2017).

4.3.2 Identifikasi Ekstrak Katekin dengan Reagen Kimia

Menurut Mutmainnah (2017), ekstrak cair diuji dengan cara diambil sedikit dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian direaksikan dengan FeCl_3 . Hasil positif katekin ditunjukkan dengan perubahan warna menjadi hitam kebiruan lalu isolat siap digunakan untuk uji selanjutnya

4.3.3 Penentuan Kadar Senyawa Katekin dalam Ekstrak dengan Spektrofotometer UV-Vis

Penentuan kadar katekin dalam ekstrak daun teh hijau mengacu pada penelitian Nur dkk., (2020) dengan langkah sebagai berikut :

4.3.1.1 Pembuatan Seri Konsentrasi Standar

Ditimbang 10 mg katekin murni lalu dilarutkan dalam 10 mL etanol sehingga diperoleh larutan induk 1000 ppm. Dibuat seri konsentrasi 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, dan 50 ppm dengan cara dipipet masing-masing sebanyak 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 dan 0,5 mL larutan induk lalu diencerkan dengan etanol dalam labu ukur 10 mL

4.3.1.2 Penentuan Kadar Katekin

Masing-masing ekstrak teh hijau dibuat larutan induk dengan konsentrasi 1000 ppm. Larutan sampel dan larutan standar diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum 280 nm dan ditentukan kadar katekin dengan metode kurva standar.

4.3.4 Optimasi fase gerak kromatografi kolom dengan KLT

Fase gerak yang akan digunakan untuk kolom ditentukan berdasarkan profil bercak yang dihasilkan dari KLT menggunakan fase gerak yang terdiri dari campuran dua atau lebih pelarut dengan perbandingan tertentu.

Disiapkan plat KLT dengan ukuran 7 x 3 cm. Ekstrak daun teh ditotolkan menggunakan pipa kapiler pada jarak 1 cm dari tepi bawah plat dengan pipa kapiler kemudian dielusi dalam chamber dengan fase gerak sebagai berikut:

- a. N-Heksan : Etil Asetat (2 : 1)
- b. Diklorometana : Metanol (5 : 1)
- c. Diklorometana : Metanol : Air (5 : 5 : 1)

Setelah gerakan larutan pengembang sampai pada garis batas, elusi dihentikan. Noda-noda pada permukaan plat dibiarkan kering lalu dilihat di bawah sinar UV pada panjang gelombang maksimum 254 nm. selanjutnya disemprot dengan Serium sulfat ($\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$) 1% dalam H_2SO_4 10% dan dipanaskan hingga muncul barcak. Dengan memperhatikan bentuk noda pada berbagai larutan pengembang ditentukan perbandingan larutan pengembang yang paling baik untuk kolom.

4.3.5 Fraksinasi dengan Metode Kromatografi Kolom

Ekstrak daun teh dengan kadar katekin tertinggi dilakukan pemisahan dengan kolom menggunakan sistem elusi gradien. Terlebih dahulu fase diam silika gel G60 sebanyak 50 kali berat sampel dimasukkan ke dalam kolom. Ekstrak sebanyak 4,06 gram yang telah tercampur dengan selit dituangkan pada bagian atas kolom yang telah berisi fase diam, lalu dielusi menggunakan fase gerak berikut.

- a. Heksan : Etil asetat (10 : 1), 880 mL
- b. Heksan : Etil asetat (5 : 1), 120 mL
- c. Heksan : Etil asetat (2 : 1), 150 mL
- d. Etil Asetat 100 mL
- e. Diklorometan : Metanol (10 : 1), 110 mL

Fraksi-fraksi yang terbentuk dianalisis dengan KLT dengan selang penotolan 2 fraksi. fraksi-fraksi dengan nilai r_f yang sama disatukan berdasarkan pola

fraksinasinya menjadi fraksi gabungan

4.3.6 Pemisahan dan Identifikasi dengan KLT Analitik

Pada pemisahan dengan KLT analitik digunakan plat silika gel dengan ukuran 7 cm x 6,5 cm. Masing-masing fraksi hasil kolom dan standar katekin ditotolkan pada jarak 1 cm dari tepi bawah plat dengan pipa kapiler kemudian dikeringkan dan dielusi dengan fase gerak diklorometan:metanol (20:1). Setelah gerakan larutan pengembang sampai pada garis batas, elusi dihentikan. Noda-noda pada permukaan plat dilihat di bawah sinar UV pada panjang gelombang maksimum 254 nm lalu disemprotkan larutan serum sulfat. Ditentukan noda-noda yang memiliki spot yang sama dengan standar katekin (Robinson, 1995).

4.3.7 Identifikasi Gugus Fungsi dengan FTIR

Mengacu pada penelitian Dettlaff et al., (2017), identifikasi gugus fungsi dilakukan dengan Spektroskopi Inframerah *Transformasi Fourier* Perkin Elmer version-10 UATR. Sampel isolat kering dihomogenkan dengan plat KBr dalam cawan porselen kemudian dimasukkan ke dalam sampel *holder* hingga seluruh bagian *diamond* tertutup untuk proses analisis. Setelah itu sampel dipress menggunakan alat PIKE tekanan 80 newton. Ditunggu hingga diperoleh spektra IR dan dilanjutkan interpretasi data.

4.3.8 Identifikasi Kadar Katekin dengan HPLC

4.3.8.1 Pembuatan Fase Gerak Sistem HPLC

Fase gerak yang akan digunakan adalah campuran 25% asetonitril dalam 75% asam asetat 0,3%. Fase gerak yang digunakan sebelumnya disaring dengan membran filter 0,45 µL.

4.3.8.2 Pembuatan Larutan Standar Katekin

Ditimbang katekin sebanyak 1 mg kemudian dilarutkan dalam 1 mL metanol, sehingga diperoleh larutan induk 1000 ppm. Dilakukan pengenceran untuk mendapatkan deret larutan standar 250; 100; 50; 25; 10; dan 5 ppm dalam 1 mL metanol. Setelah itu disaring melalui filter membran 0,45 µm.

4.3.8.3 Pembuatan Larutan Uji Isolat Teh Hijau

Isolat ditimbang sebanyak 25 mg lalu dilarutkan dalam 5 mL metanol untuk memperoleh larutan uji 5000 ppm. Kemudian dibuat isolat konsentrasi 2500 ppm dengan dipipet 0,5 mL larutan uji 5000 ppm dan ditambahkan metanol hingga 1 mL. Setelah itu disaring melalui filter membran 0,45 µm.

4.3.8.4 Analisis Kadar Katekin dengan HPLC

Dinyalakan instrumen HPLC, detektor dan komputer. Fase diam yang digunakan adalah C₁₈. Dimasukkan fase gerak agar melewati kolom selama 10 menit dengan temperature kolom 30 °C. Diatur kecepatan alir fase gerak yaitu 0,5 mL/menit dengan panjang gelombang 280 nm dan dipastikan kestabilan *base line*. Diinjeksikan 20 µL larutan standar ke dalam injektor dalam posisi *load*. Dihidupkan injektor pada posisi *inject* dan secara simultan. Dibiarkan terjadi elusi. Dilakukan langkah yang sama untuk sampel.

4.3.9 Uji Kepekaan Senyawa Katekin terhadap *Mycobacterium tuberculosis*

Pengujian aktivitas antibakteri *Mycobacterium tuberculosis* pada senyawa katekin dilakukan melalui *Drug Susceptibility Testing* (DST) dengan instrument BACTEC MGIT 960 (WHO, 2018). Menurut Siddiqi & Gerdes (2006) langkah uji kepekaan dapat dilakukan sebagai berikut :

4.3.9.1 Pembuatan Stok Ekstrak dan Isolat

Ekstrak uji ditimbang seksama sebanyak 25 mg dan dilarutkan menggunakan metanol sebanyak 5 mL ke dalam vial, kemudian dihomogenkan. Sampel disimpan sebagai larutan stok ekstrak 5000 ppm. Setelah itu dibuat konsentrasi 2500 ppm dengan cara diambil larutan stok sebanyak 0,5 mL lalu dicukupkan hingga 1 mL menggunakan metanol untuk uji kepekaan terhadap pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv.

Isolat ditimbang seksama sebanyak 25 mg dan dilarutkan menggunakan metanol sebanyak 5 mL ke dalam vial, kemudian dihomogenkan. Sampel disimpan sebagai larutan stok isolat 5000 ppm. Setelah itu dibuat konsentrasi 2500 ppm dengan cara diambil larutan stok sebanyak 0,5 mL lalu dicukupkan hingga 1 mL menggunakan metanol untuk uji kepekaan terhadap pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv

4.3.9.2 Pembuatan Stok OAT

Pembuatan Streptomisin (1 µg/mL), levofloksasin (1 µg/mL), dan moksifloksasin (1 µg/mL), masing-masing dibuat dengan dilarutkan sebanyak 10 mg Streptomisin, levofloksasin, dan moksifloksasin dalam 2,5 mL akuades steril sehingga diperoleh kadar 4000 ppm (µg/mL). Kemudian diencerkan dengan cara diambil larutan 4000 µg/mL sebanyak 0,0025 mL dan ditambahkan akuades hingga 10 mL sehingga diperoleh kadar 1 µg/mL

4.3.9.3 Uji Sterilitas Sediaan Stok

Ditimbang media nutrien agar sebanyak 15 g dan dilarutkan ke dalam 500 mL akuades lalu diautoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. Ditambahkan darah segar (steril) ke dalam media dan dihomogenkan. Media NA dituang ke dalam cawan petri, dibiarkan sampai memadat. Ekstrak dan 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 lalu diinkubasi secara terbalik selama 24 jam pada suhu 36 °C. Diamati pertumbuhan mikroorganisme menggunakan bantuan alat *electric bakteri colony counter* (health) (RSPG, 2021).

4.3.9.4 Persiapan Inokulum dari Pertumbuhan Positif MGIT (Subkultur)

Inokulum positif MGIT direinkubasi selama 1 hari pada suhu 37 °C lalu dicampur. Diambil inokulum sebanyak 0,8 mL dan dicampur dengan larutan garam 4 mL (1:5) dan diaduk untuk memecah gumpalan

4.3.9.5 Uji Kepekaan OAT dan Senyawa Katekin terhadap MTB

Diberi label pada 5 tabung MGIT 7 mL. 1 tabung *Growth Control* (GC) dan 4 tabung untuk masing-masing ekstrak dan isolat. Proses ini dilakukan duplo. Semua proses dilakukan dalam LAF.

Disiapkan H37Rv yang telah disubkultur lalu dihomogenisasi dengan divortex selama 15 menit. MGIT SIRE suplemen dipipet secara aseptik sebanyak 0,8 mL lalu dimasukkan ke dalam tabung GC dan tabung sampel dan dilakukan duplo. Dipipet ekstrak dan fraksi ke dalam masing-masing tabung selain GC. Dilakukan pengenceran pada H37Rv yang telah disubkultur selama 3 hari dengan dipipet 0,5 mL lalu dilarutkan dalam 4,5 mL NaCl steril. Dipipet 100 µL isolat dan

ekstrak lalu dimasukkan ke masing-masing tabung MGIT selain GC. Ditambahkan 0,5 mL suspensi bakteri hasil pengenceran ke dalam masing-masing tabung MGIT berlabel ekstrak dan fraksi. Ditambahkan 0,5 mL hasil pengenceran pada GC ke dalam tabung MGIT berlabel GC. Pastikan tabung yang diinokulasi tercampur dengan baik (homogen)

Disusun masing-masing tabung yang telah disiapkan pada rak yang sesuai. Dibawa rangkaian AST ke instrumen MGIT menggunakan rak pengangkut AST. Dibuka laci instrumen yang diinginkan. Dipindai *barcode* pada rak AST. Dimasukkan tabung dengan hati-hati ke dalam rak instrumen yang ditentukan. Dipastikan semua tabung dan rak terpasang di laci. Ditutup laci instrumen dan ditunggu hasil pembacaan. Hasil pemeriksaan didapatkan dari mesin setelah inkubasi 12 hari, yaitu dengan ditandai mesin MGIT akan mengeluarkan sinyal merah (positif) bila *Growth Unit* (GU) dalam tabung 400.

4.3.10 Uji Aktivitas Antibakteri terhadap *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* dan *Escherichia coli*

4.3.10.1 Suspensi bakteri

Terlebih dahulu dilakukan proses peremajaan bakteri dalam medium nutrient broth dengan dibuat sebanyak 0,13 gram ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan dengan 10 mL aquades. Dihomogenkan media dan diautoklaf selama 2 jam pada suhu 121 °C. Setelah dingin, dimasukkan medium ke tabung reaksi steril dan ke dalamnya ditumbuhkan bakteri sebanyak 1 tube sebagai proses subkultur. Ditutup tabung dengan plastik wrap lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C.

4.3.10.2 Proses Uji Aktivitas Antibakteri

Metode yang digunakan dalam uji aktivitas antibakteri ini adalah metode difusi kertas cakram. Merujuk pada penelitian Nurhayati dkk (2020), proses diawali dengan ditimbang 0,42 gram medium *Mueller Hinton Broth* (MHB) dan 0,56 gram nutrien agar, kemudian ditambahkan 20 mL aquades dan diautoklaf selama 2 jam pada suhu 121 °C. Larutan dituang ke dalam cawan petri dan ditunggu hingga memadat. Bakteri yang telah diremajakan 24 jam kemudian dioleskan dan diratakan pada permukaan media dengan menggunakan *cotton swab* steril. Kertas cakram

yang telah mengandung senyawa antibakteri dan antibiotik diletakkan di atas permukaan agar. Ditunggalkan cawan petri dan direkatkan dengan plastik wrap. Setelah itu diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Adanya aktivitas antibakteri ditandai dengan zona hambat yang diukur diameternya menggunakan penggaris.

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Ekstraksi Teh Hijau dengan Metode Maserasi

Pada penelitian ini, teknik ekstraksi yang digunakan untuk mengambil senyawa aktif pada teh hijau, khususnya katekin adalah maserasi. Pemilihan metode maserasi disebabkan karena mengalami dekomposisi atau kerusakan oleh oksidasi senyawa fenolik, sehingga dapat menyebabkan penurunan kadar senyawa fenolik. Proses maserasi menggunakan variasi 3 pelarut yaitu etanol 96%, etil asetat dan air mendidih. Digunakan pelarut etanol karena etanol merupakan pelarut universal yang dapat melarutkan sebagian besar senyawa flavonoid yang terkandung dalam herbal, termasuk katekin yang memiliki kepolaran yang hampir sama. Pelarut etil asetat digunakan sebagai pembanding yang memiliki sifat berbeda dengan etanol yaitu semi polar, sedangkan air dipilih karena merupakan pelarut polar yang mampu melarutkan katekin tetapi dengan proses pemanasan karena sifat katekin yaitu tidak dapat larut dalam air biasa.

Proses perendaman dengan pelarut dilakukan pada shaker untuk meratakan distribusi cairan penyari dan mempercepat proses pelarutan dengan adanya kontak antara pelarut dan sampel secara sempurna. Untuk memperoleh ekstrak yang kering, pelarut diuapkan dengan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak kering. Proses ini berfungsi juga untuk memisahkan senyawa klorofil, karena jika kadar klorofil terlalu tinggi, maka hal ini dapat mengganggu proses identifikasi senyawa katekin pada Kromatografi Lapis Tipis dan reaksi warna. Perolehan hasil ekstrak kering yang dapat dilihat pada **Tabel 2** berikut. Ekstrak yang dihasilkan berupa ekstrak kering berwarna coklat kehitaman dengan aroma khas daun teh hijau.

Tabel 2. Hasil Ekstrak Kering Teh Hijau

No	Pelarut	Lama Ekstraksi (menit)	Ekstrak kering (gram)	Rendemen (%)
1	Etanol	30	6,405	12,81
		60	7,339	14,678
2	Etil Asetat	30	2,284	4,568
		60	2,784	5,568
3	Air	30	23,071	46,142
		60	11,684	23,368

Berdasarkan **Tabel 2**, perlakuan waktu ekstraksi dan jenis pelarut berpengaruh terhadap hasil ekstrak teh hijau. Ekstraksi dengan pelarut etanol dan etil asetat menghasilkan lebih banyak rendemen pada waktu perendaman 60 menit. Hal ini karena waktu ekstraksi yang semakin lama menyebabkan semakin lama kontak antara padatan dengan solven sehingga memperbanyak jumlah sel yang pecah dan bahan aktif yang terlarut (Wahyuni dan Widjanarko, 2015). Kondisi ini akan terus berlanjut hingga tercapai kondisi kesetimbangan antara konsentrasi senyawa di dalam daun teh hijau dengan konsentrasi senyawa dalam pelarut. Sementara pada ekstrak air yang melalui proses pemanasan, dihasilkan lebih banyak pada waktu maserasi 30 menit. Hal ini terjadi karena telah tercapainya kondisi kesetimbangan sehingga zat terlarut jenuh serta waktu maserasi yang melewati waktu optimum berpotensi meningkatkan proses hilangnya senyawa-senyawa yang tidak tahan panas seperti minyak atsiri ataupun senyawa lain karena penguapan (Cikita et al., 2016). Hasil yang diperoleh menunjukkan perolehan rendemen yang lebih baik dibandingkan penelitian Sudjatini (2017), bahwa ekstrak teh hijau dengan pelarut air suling pada waktu 35 menit menunjukkan rendemen yang tinggi yaitu sebesar 41,39 % dari berat kering teh hijau.

Jenis pelarut dengan perbedaan polaritas juga mempengaruhi hasil ekstrak yang diperoleh. Dari ketiga variasi pelarut, hasil ekstrak dengan pelarut air mendidih lebih banyak dibandingkan etanol dan etil asetat. Hal ini karena teh hijau mengandung banyak senyawa fenolik yang memiliki dua cincin aromatik dengan gugus hidroksil lebih dari satu sehingga memiliki kelarutan yang baik dalam air yang merupakan pelarut paling polar di antara etanol dan etil asetat. Air juga

merupakan pelarut yang sangat baik untuk melarutkan senyawa ion maupun non ionik (kovalen). Gugus -OH yang bersifat polar dan memberikan suatu dipol yang perlu untuk mensolvasi kation dan anion keduanya. Adanya perlakuan pemanasan pada pelarut air juga dapat mempengaruhi hasil ekstrak yang diperoleh karena menurut Damanik *et al.* (2014) suhu yang semakin tinggi dapat menyebabkan gerakan partikel ke pelarut semakin cepat karena suhu mempengaruhi nilai koefisien transfer masa dari suatu komponen. Kenaikan suhu juga menyebabkan permeabilitas sel semakin lemah sehingga memudahkan pelarut untuk mengekstrak zat aktif pada bahan (Ramadhan & Phasa, 2010).

5.2 Identifikasi Ekstrak dengan Reagen Kimia

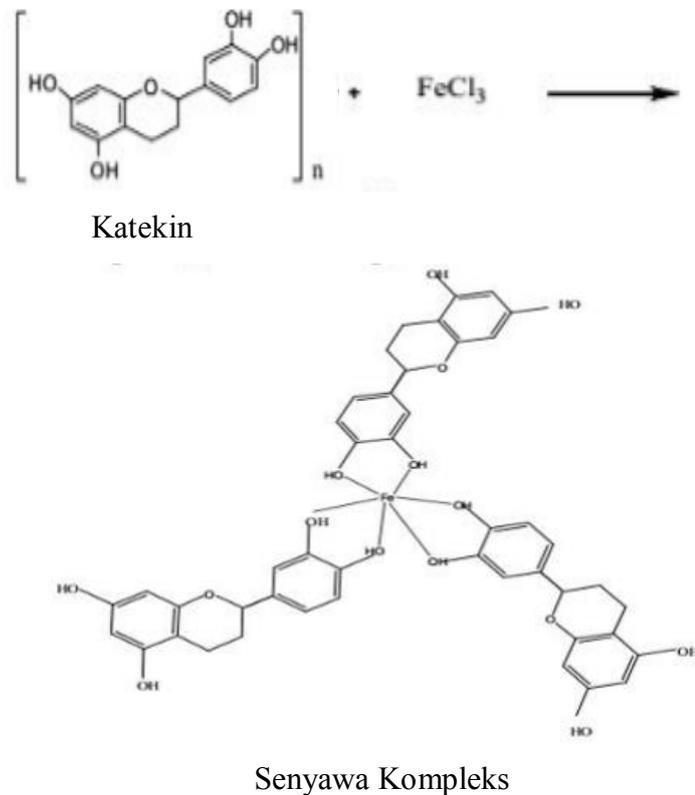
Identifikasi dengan reagen kimia terhadap ekstrak yang telah diperoleh berfungsi untuk mengetahui secara kualitatif adanya senyawa flavonoid termasuk katekin. Reagen kimia yang digunakan yaitu FeCl_3 , karena dengan adanya ion Fe^{3+} (besi) dapat membentuk ikatan kompleks dengan gugus fenol (-OH) dari sampel yang ditandai dengan terbentuknya perubahan warna kompleks menjadi hijau, biru atau merah kehitaman. Berikut ini hasil yang menunjukkan adanya perubahan warna yang terjadi pada masing-masing sampel dengan pelarut yang berbeda.

Tabel 3. Hasil Identifikasi Ekstrak dengan FeCl_3

Sampel	Lama Ekstraksi (menit)	Warna Awal	Perubahan Warna	Hasil
Ekstrak Etanol	30	Hijau	Hijau Kehitaman	+
	60	Kekuningan	Hijau Kehitaman	+
Ekstrak Etil Asetat	30	Hijau	Hijau Kehitaman	+
	60		Hijau Kehitaman	+
Ekstrak Air	30	Kuning	Hijau Kehitaman	+
	60		Hijau Kehitaman	+

Berdasarkan **Tabel 3**, menunjukkan bahwa semua sampel memberikan reaksi positif dengan penambahan reagen FeCl_3 membentuk kompleks warna hijau kehitaman, sehingga dapat diketahui bahwa sampel ekstrak teh hijau dengan pelarut etanol, etil asetat dan air baik dengan waktu ekstraksi 30 menit maupun 60 menit positif mengandung katekin.

Berikut ini hasil reaksi katekin dengan FeCl_3 :



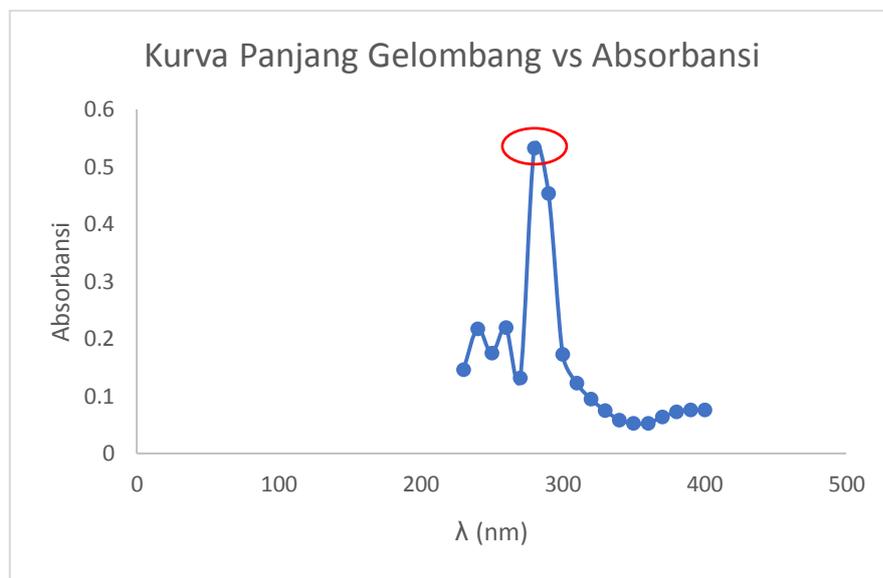
Gambar 13. Reaksi Perkiraan Katekin dengan FeCl_3 (Soerya, et al., 2005)

5.3 Penentuan Kadar Senyawa Katekin dalam Ekstrak dengan Spektrofotometer UV-Vis

Analisis kuantitatif senyawa katekin dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dilakukan untuk mengetahui kadar katekin yang terkandung dalam ekstrak teh hijau yang memiliki banyak aktivitas farmakologi baik sebagai pencegahan maupun pengobatan penyakit. Metode ini dipilih karena katekin memiliki gugus kromofor yang mengandung sistem aromatik berupa ikatan

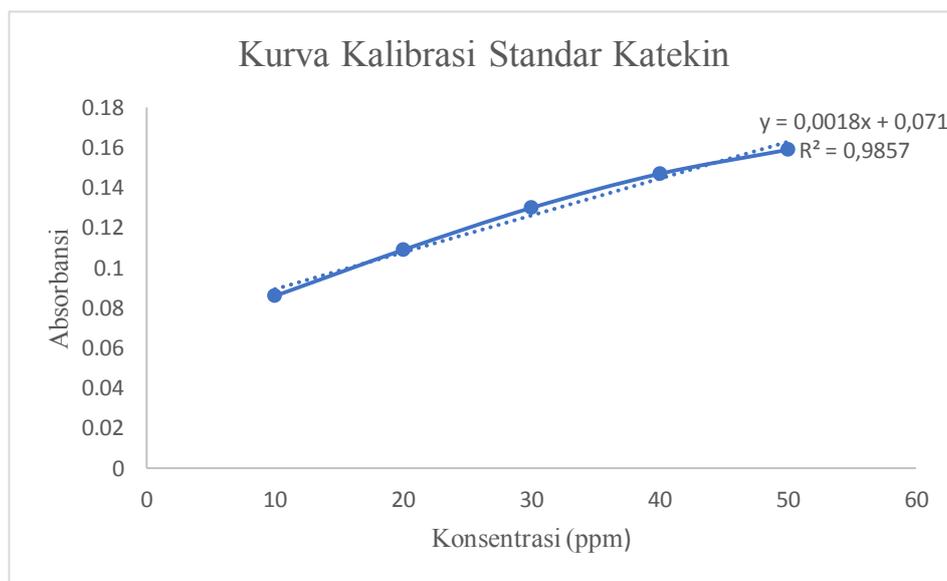
rangkap terkonjugasi, dimana gugus ini akan menyerap atau mengabsorpsi radiasi elektromagnetik di daerah panjang gelombang UV dan *Visible* (Husni & Puspitaningrum, 2017). Katekin merupakan senyawa golongan flavanoid yang juga merupakan jenis tanin terkondensasi, yang sering disebut dengan polifenol.

Pada penelitian ini digunakan standar katekin sebagai larutan standar dengan deret konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50 ppm. Deret konsentrasi tersebut digunakan karena penentuan kadar ini menggunakan metode kalibrasi standar yang memerlukan kurva baku untuk memperoleh persamaan linear. Pengukuran serapan panjang gelombang maksimum dilakukan pada rentang 230-400 nm dengan interval 10 nm. Berdasarkan **Gambar 14**, panjang gelombang maksimum yang diperoleh pada larutan standar katekin adalah 280 nm. Hal ini sesuai dengan literatur yang menyebutkan bahwa panjang gelombang antara 278,4-280 nm merupakan panjang gelombang maksimum yang biasa digunakan untuk mendeteksi katekin (Bhardwaj et al., 2017; Zhang et al., 2013). Panjang gelombang tersebut kemudian digunakan untuk mengukur serapan kurva kalibrasi standar dan sampel ekstrak teh hijau.



Gambar 14. Kurva Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Katekin

Setelah diperoleh panjang gelombang maksimum, selanjutnya dilakukan pengukuran absorbansi pada larutan standar katekin dengan berbagai konsentrasi yaitu 10, 20, 30, 40, dan 50 ppm pada panjang gelombang 280 nm menggunakan instrumen Spektrofotometer UV-Vis. Selanjutnya absorbansi yang telah diperoleh digunakan pada perhitungan persamaan regresi linear dari kurva baku. Berikut merupakan hasil penentuan kurva kalibrasi larutan standar katekin.



Gambar 15. Kurva Kalibrasi Standar Katekin dengan UV-Vis

Dari pengukuran tersebut, dapat dilihat hasil pengukuran kalibrasi standar diplotkan antara konsentrasi dan absorbansinya, sehingga diperoleh persamaan regresi linear yaitu $y = 0,0018x + 0,071$ dengan nilai Koefisien Determinasi (R^2) yang diperoleh sebesar 0,9857 yang mendekati satu membuktikan bahwa persamaan regresi tersebut adalah linear. Hasil tersebut dapat dilihat bahwa terdapat korelasi yang positif antara konsentrasi dan absorbansi, yaitu semakin tinggi konsentrasi standar, semakin tinggi pula absorbansi yang diperoleh.

Selanjutnya dilakukan penentuan kadar katekin pada sampel dengan memasukkan nilai absorbansi sampel sebagai y pada persamaan garis, sehingga dapat diperoleh kadar masing-masing ekstrak teh hijau dengan variasi pelarut dan waktu sebagai berikut:

Tabel 4. Hasil Kadar Senyawa Katekin

Sampel	Waktu Ekstraksi (menit)	Absorbansi	Kadar (ppm)	Kadar (%)
Etanol	60	0,241	94,44	9,44
	30	0,219	82,22	8,22
Etil Asetat	60	0,135	35,56	3,56
	30	0,094	12,78	1,28
Air	60	0,096	13,89	1,39
	30	0,093	12,22	1,22

Hasil pembacaan spektrofotometer UV-Vis menunjukkan kadar katekin pada ekstrak etanol lebih besar dibandingkan dengan ekstrak etil asetat dan air. Hal ini karena adanya prinsip *like dissolve like* dimana katekin merupakan senyawa fenolik yang mengandung gugus hidroksil sehingga memiliki kelarutan yang baik dalam etanol yang juga bersifat polar karena memiliki gugus -OH. Kadar terbanyak ini terjadi pada waktu maserasi 60 menit, karena dengan semakin lamanya kontak antara serbuk daun teh hijau dengan pelarut etanol, maka semakin banyak jumlah sel tanaman yang pecah sehingga senyawa aktif katekin akan lebih banyak yang larut. Sementara pada ekstrak air dan etil asetat memiliki kadar yang berbeda cukup signifikan dengan ekstrak etanol, karena pada pelarut air dengan proses pemanasan memungkinkan belum optimalnya proses pemanasan karena adanya pengaruh suhu ruang dan penguapan pelarut yang dapat mempengaruhi penarikan senyawa yang kurang baik. Sedangkan pada pelarut etil asetat, kurang optimal dalam mengekstrak senyawa katekin karena pelarut ini memiliki sifat semi polar, sehingga cenderung melarutkan senyawa-senyawa baik polar maupun non polar. Hal ini sesuai dengan penelitian Ediningsih & Rahyuningsih (2019), melalui penetapan kadar ekstrak dengan UV-Vis dan diperoleh kadar katekin tertinggi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol dibandingkan etil asetat dan metanol. Sedangkan penelitian yang dilakukan oleh Nur dkk., (2020) dihasilkan kadar katekin pada ekstrak etanol daun teh hijau sebesar $5,85 \pm 0,22$ %. Dalam hal ini hasil penentuan kadar katekin dalam ekstrak etanol teh hijau dalam penelitian ini lebih besar yaitu 9,44%.

5.4 Optimasi Fase Gerak Kolom dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Berdasarkan hasil analisis kadar dengan UV-Vis, ekstrak etanol memiliki kadar katekin tertinggi sehingga dilanjutkan untuk proses pemisahan dengan Kromatografi kolom. Fase gerak yang akan digunakan dioptimasi terlebih dahulu dengan KLT. KLT merupakan metode pemisahan senyawa kimia berdasarkan pemisahan senyawa dalam fase diam dan fase gerak. Dalam analisis ini menggunakan fase diam berupa plat KLT silika gel. Sedangkan fase gerak yang digunakan adalah kombinasi eluen polar dan non polar dengan perbandingan tertentu. Apabila noda yang dihasilkan terlalu tinggi, maka kecepatannya dapat dikurangi dengan menambah kepolaran, sedangkan apabila nodanya bergerak lambat maka dapat dikurangi kepolarannya.

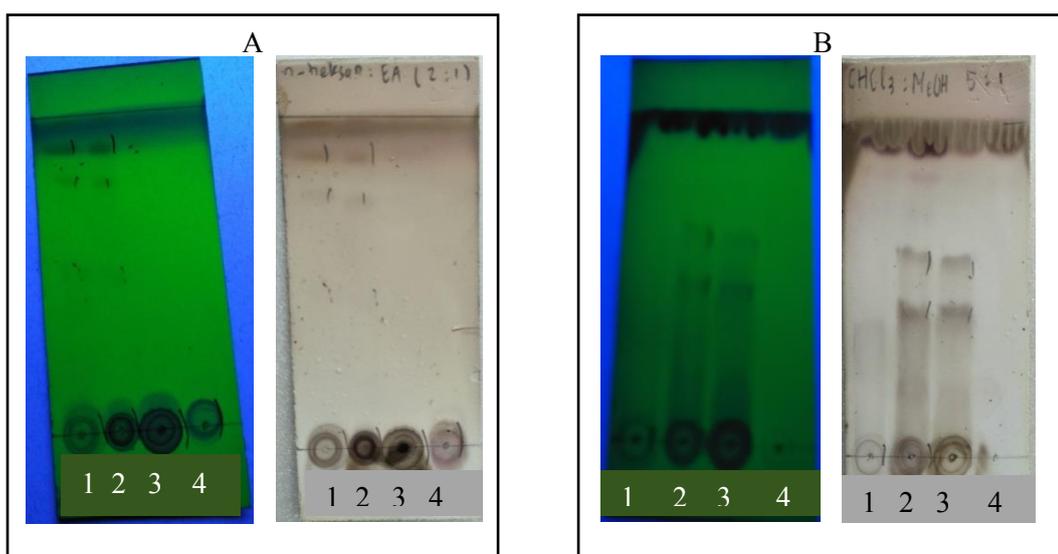
Disiapkan plat KLT dan dibuat garis batas atas dan bawah dengan pensil untuk memudahkan menghitung nilai Rf. Digunakan pensil karena terbuat dari karbon yang bersifat *inert* sehingga tidak dapat bereaksi dengan eluen yang digunakan. Masing-masing ekstrak etil asetat, etanol dan air ditotolkan pada garis batas bawah KLT yang telah dibuat sebelumnya. Penotolan tersebut diupayakan sekecil mungkin menggunakan alat pipa kapiler dan dilakukan secara hati-hati agar lapisan penyerap tidak rusak dan noda yang dihasilkan tidak melebar sehingga tidak mempengaruhi nilai Rf nya.

Sebelum proses pemisahan, dilakukan proses penjenuhan fase gerak dalam chamber. Fase gerak yang terdiri dari pelarut yang mudah menguap dan memiliki titik didih rendah akan mengakibatkan terjadinya efek tepi dan melengkungnya bentuk garis depan eluen. Hal ini karena terjadinya penguapan tidak hanya dari atas ke bawah, tetapi juga dari tepi ke tengah chamber. Penjenuhan dapat berlangsung selama 2-15 menit. Setelah eluen jatuh, maka dilakukan proses pemisahan dengan memasukkan plat KLT yang telah ditotol sampel ke dalam *chamber*. Fenomena awal yang terjadi yaitu adanya keseimbangan antara fase eluen dan fase uap eluen dalam chamber. Ketika lempeng KLT kontak langsung dengan uap eluen, terjadi interaksi antara sorben lempeng KLT dengan molekul uap pelarut. Pelarut akan bergerak melewati sorben lempeng KLT melalui gaya kapilaritas dan berinteraksi dengan uap eluen secara simultan.

Setelah proses elusi selesai, diangkat plat KLT dan dibiarkan kering. Dianalisis hasil KLT menggunakan lampu UV pada panjang gelombang 254 nm dan disemprot dengan larutan serum sulfat lalu dibakar. Analisis ini dilakukan panjang gelombang 254 nm karena semua senyawa memberikan absorbansi yang baik dalam panjang gelombang tersebut. Penampakan noda berwarna gelap pada sinar UV disebabkan adanya daya interaksi antara sinar UV dengan indikator fluoresensi pada lempeng KLT.

Penentuan sistem eluen dengan KLT ini dilakukan menggunakan 2 jenis eluen, yang bertujuan untuk mencari sistem eluen yang mampu memberikan pemisahan terbaik dalam memisahkan senyawa katekin dari daun teh hijau serta mengetahui profil pemisahannya. Sistem eluen terbaik akan digunakan dalam proses pemisahan senyawa dengan kromatografi kolom. Eluen yang baik adalah eluen yang dapat memisahkan senyawa dalam jumlah banyak ditandai dengan noda-noda yang terbentuk tidak berekor dan jarak antara noda satu dengan yang lainnya jelas.

Fase diam yang digunakan adalah silika gel GF₂₅₄. Fase gerak yang digunakan dalam pemisahan ini antara lain: N-heksana : Etil asetat (2 : 1) dan diklorometana : Metanol (5 : 1). Berikut ini dapat dilihat pola kromatogram dari ekstrak teh hijau pada **Gambar 16**.



Gambar 16. Hasil Identifikasi KLT dengan Eluen (A) N-Heksana : Etil Asetat (2:1); (B) Diklorometana : Metanol (5:1)

Keterangan:

a = Sinar UV 254 nm

b = Setelah Disemprot larutan Serium Sulfat dan Dibakar

1 = Ekstrak etil asetat

2 = Ekstrak Etanol

3 = Ekstrak Air

4 = Standar Katekin

Dari hasil KLT pada fase gerak N-heksana – etil asetat (2:1) terlihat bahwa senyawa sudah terelusi dengan menghasilkan 3 spot dan memberikan hasil pemisahan yang baik, sedangkan dengan fase gerak diklorometana : metanol (5:1), senyawa sudah terelusi dengan membentuk spot-spot, tetapi antar noda belum terpisah secara sempurna dan membentuk ekor. Berdasarkan pemisahan hasil KLT, dapat diurutkan fase gerak yang akan digunakan untuk kromatografi kolom pertama disesuaikan dengan memperhatikan tingkat kepolaran agar senyawa-senyawa non polar keluar lebih dulu. Sistem eluen yang digunakan adalah gradien dengan komposisi pelarut dimulai dari N-heksana : Etil Asetat dengan perbandingan (10:1), (5:1), (2:1), (0:1) dan untuk pelarut yang lebih polar digunakan pelarut Diklorometana : Metanol dengan perbandingan (10:1), (5:1) dan (2:1)

5.5 Isolasi Senyawa Katekin dengan Kromatografi Kolom dan Analisis KLT

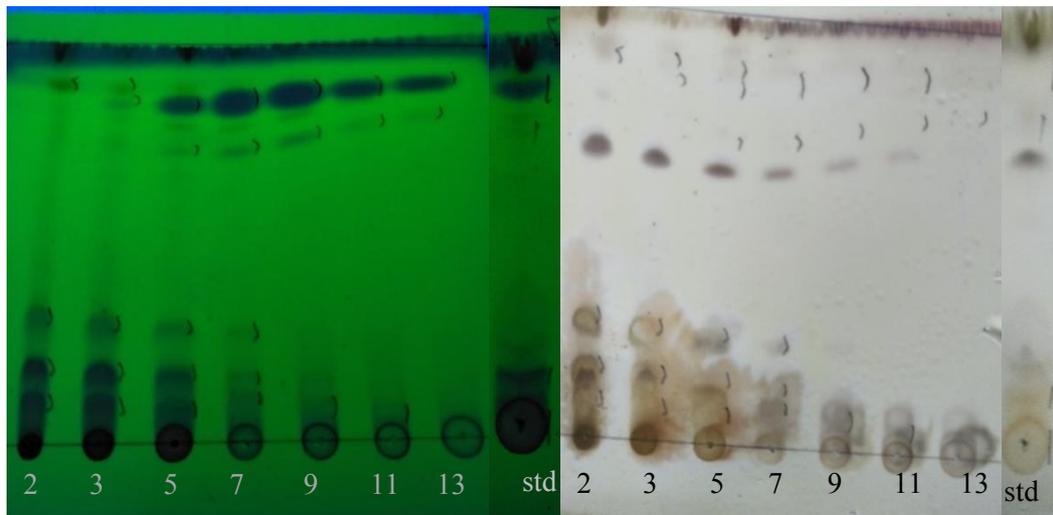
Isolasi senyawa katekin dari ekstrak teh hijau dilakukan menggunakan metode kromatografi kolom. Prinsipnya didasarkan pada perbedaan kecepatan perambatan komponen-komponen sesuai kepolarannya, yang akan didistribusikan ke dalam dua fase antara fase diam dan fase gerak. Fase diam akan menjerap senyawa, sedangkan fase gerak akan melarutkan senyawa. Senyawa yang lebih cenderung terdistribusi ke dalam fase diam akan tertahan dan terelusi lebih lama, sementara senyawa yang terdistribusi ke dalam fase gerak akan bergerak lebih cepat dan lebih dahulu terelusi.

Sebanyak 4,06 gram ekstrak teh hijau difraksinasi menggunakan fase diam silika gel G60, sedangkan fase gerak yang digunakan adalah sistem gradien yang telah ditentukan berdasarkan hasil optimasi dengan KLT. Disiapkan kolom yang akan digunakan. Pengisian kolom ini dibuat dengan metode basah yaitu dengan melarutkan fase diam dengan eluen hingga homogen dan membentuk bubur silika. Penggunaan metode basah tersebut bertujuan agar di dalam kolom tidak ada

rongga-rongga udara. Bubur silika dalam kolom diketuk-ketuk hingga tidak terbentuk gelembung atau retakan dan didiamkan untuk memaksimalkan kerapatan dari fase diam. Kerapatan fase diam memiliki pengaruh yang besar terhadap kemampuan menyerap suatu komponen.

Ekstrak teh hijau yang akan digunakan dicampur dengan *celite* hingga menyatu untuk menghilangkan protein dan berbagai impuritas termasuk klorofil dari suatu bahan organik (Sharpe, 2005). Campuran kemudian dimasukkan ke dalam kolom dan dibiarkan beberapa saat supaya terserap ke dalam fasa diam. Selanjutnya dilakukan elusi dengan eluen sistem gradien dengan perbandingan eluen n-heksana : etil asetat yaitu 10:1, 5:1, 2:1, 0:1, selanjutnya ditingkatkan kepolaran eluennya dengan menambahkan eluen diklorometana : metanol dengan perbandingan 10:1, 5:1, dan 2:1. Pemurnian dengan cara gradien ini bertujuan agar senyawa-senyawa kimia dalam ekstrak teh hijau yang mempunyai perbedaan polaritas dapat memberikan hasil pemisahan yang lebih baik. Selanjutnya dibiarkan terjadi elusi hingga terlihat pigmen teh hijau turun dan mulai menetes. Tetesan selanjutnya yang keluar dari kolom ditampung dalam vial dan diganti vial lain jika warna yang keluar dari kolom berubah. Kemudian eluat yang telah ditampung dalam vial-vial diuji dengan menggunakan plat KLT silika gel.

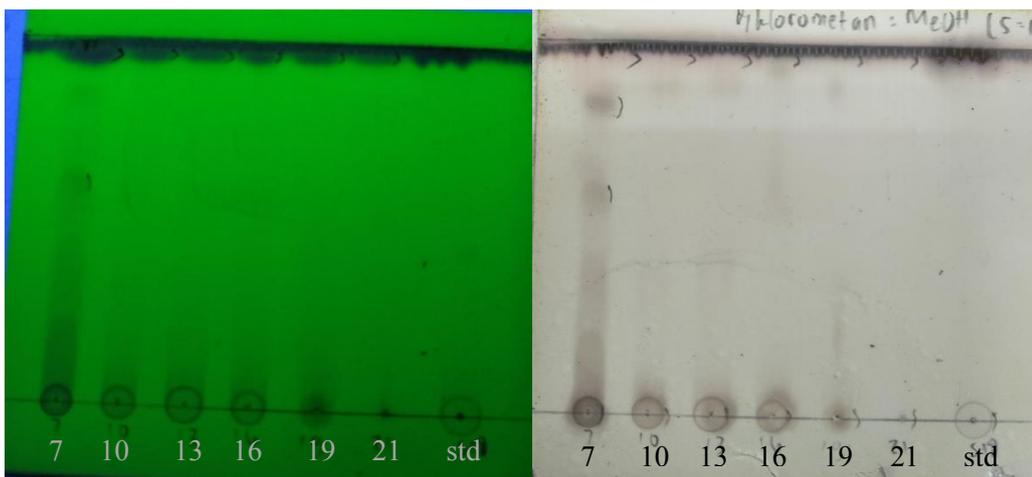
Pendugaan senyawa katekin secara kualitatif terhadap hasil fraksi diperoleh dilakukan dengan metode KLT berdasarkan penampakan noda dan nilai Rf yang dihasilkan. Pada saat kolom pertama menghasilkan 21 fraksi. fraksi-fraksi tersebut dilakukan uji KLT dengan selang penotola n 2 fraksi dan diamati profil pemisahannya pada lampu UV 254 nm dan disemprot dengan serum sulfat disertai dengan pembakaran. Ditentukan noda dari fraksi-fraksi yang telah dianalisis yang memiliki noda sejajar dengan noda standar katekin dan dibandingkan nilai Rf nya. Berikut hasil kromatogram kolom pertama fraksi-fraksi teh hijau pada plat KLT :



(A)

(B)

Diklorometana : Metanol (10:1)



(C)

(D)

Diklorometana : Metanol (5:1)

Gambar 17. Kromatogram Fraksi Kolom Pertama

Keterangan:

Gambar A dan C = Penampak Noda pada Sinar UV 254 nm

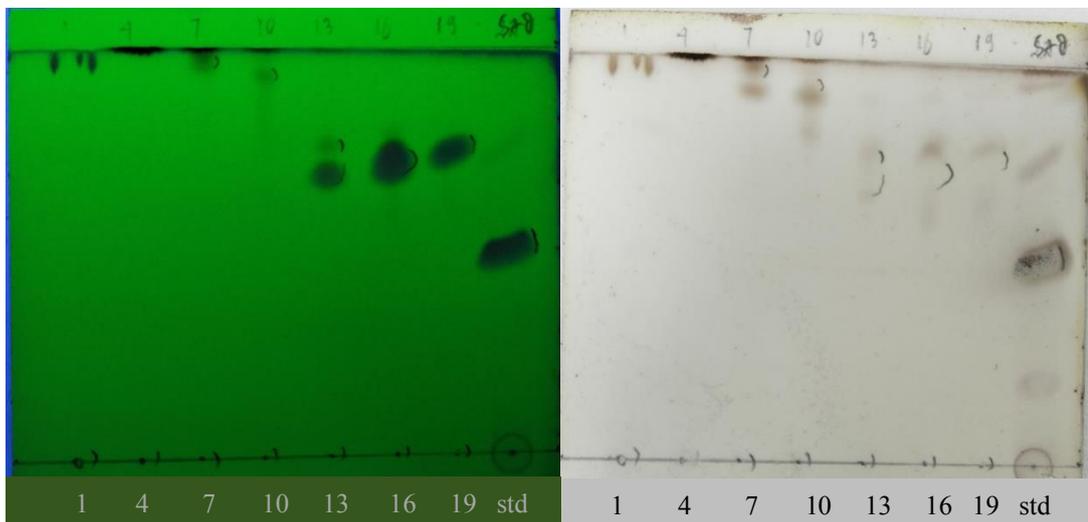
Gambar B dan D = Penampak Noda setelah Disemprot Larutan Serium Sulfat dan Dibakar

2-21 = Fraksi 2-21

Std = Standar Katekin

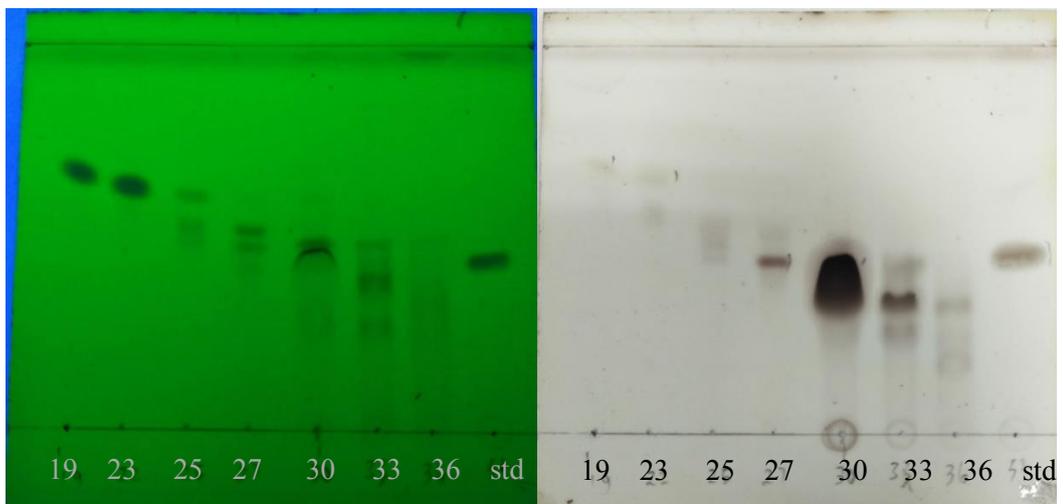
Berdasarkan pola kromatogram pada monitoring hasil kolom pertama dengan KLT, diperoleh bahwa pada fraksi dengan eluen diklorometana : metanol (10:1) memiliki pola pemisahan spot noda yang mirip dengan spot standar katekin

dengan nilai R_f 0,68. Fraksi-fraksi tersebut antara lain fraksi 2,3,5,7,9 dengan nilai R_f masing-masing adalah 0,68; 0,66; 0,64; 0,64; 0,68. Fraksi 2-9 tersebut digabung sebanyak 3,55 gram dan dilakukan pemisahan lanjutan dengan kromatografi kolom kedua agar diperoleh hasil pemisahan yang lebih optimal dan lebih murni. Eluen yang digunakan yaitu diklorometana : metanol dengan perbandingan (20:1), (10:1), dan (5:1) dengan sistem elusi bertahap (gradien) dan menghasilkan 68 fraksi. Fraksi-fraksi yang dihasilkan dianalisis pola kromatogramnya dengan KLT. Analisis dengan KLT pada fraksi hasil kolom kedua menggunakan eluen diklorometana : metanol (20:1). Berikut hasil kromatogram fraksi-fraksi dari kolom kedua dengan selang penotolan setiap 3 fraksi:



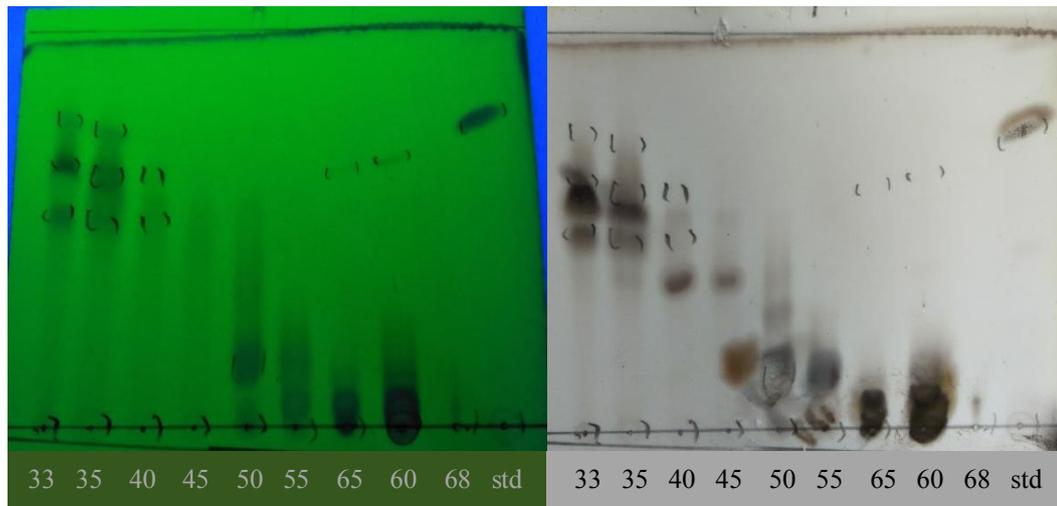
A

B



C

D



E

F

Gambar 18. Kromatogram Fraksi Kolom Kedua

Keterangan:

Gambar A, C), E = Penampak Noda pada Sinar UV 254 nm

Gambar B, D, F = Penampak Noda setelah Disemprot Larutan Serum Sulfat dan Dibakar

1-68 = Fraksi 1-68

Std = Standar Katekin

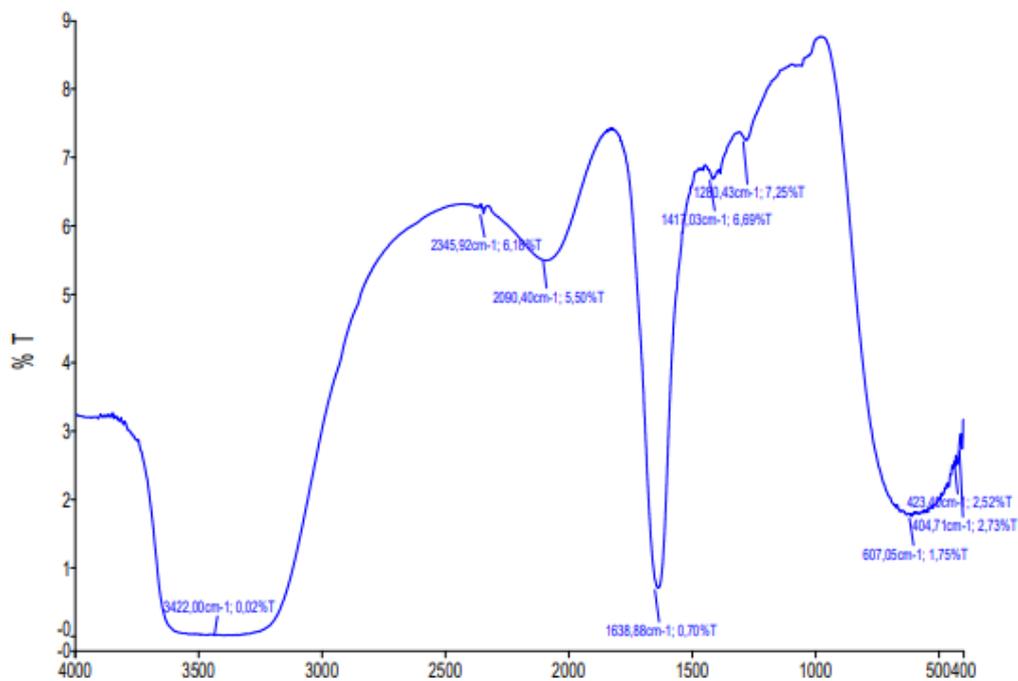
Berdasarkan hasil kromatogram KLT, pada fraksi 1-25, belum ditemukan adanya spot yang sama dengan standar. Hal ini dimungkinkan pada fraksi 1-25 merupakan kumpulan senyawa-senyawa non polar yang terelusi terlebih dahulu oleh fase gerak yang juga cenderung bersifat polar. Senyawa yang memiliki polaritas hampir sama dengan fase geraknya akan terelusi terlebih dulu dibandingkan senyawa dengan sifat polaritas yang berbeda dengan fase geraknya. Hal ini yang mengakibatkan nilai Rf dari masing-masing noda berbeda karena jarak tempuh antara senyawa dan fase geraknya tergantung pada sifat polaritasnya.

Fraksi selanjutnya memiliki posisi noda dan nilai Rf yang hampir sama dengan standar katekin yaitu fraksi 27-33 yang diduga mengandung katekin, namun spot-spot tersebut bukan spot tunggal sehingga memungkinkan belum dihasilkan isolat katekin yang murni. Gabungan fraksi tersebut menghasilkan padatan isolat sebesar 208,9 mg. Sedangkan pada fraksi 36-68 sudah tidak ada spot yang mirip dengan standar dan memiliki pola kromatogram yang masih menumpuk. Diduga senyawa-senyawa tersebut merupakan senyawa yang sangat polar dibandingkan

catekin, sehingga akan terjerap lebih lama pada fase diam dan menyebabkan nilai R_f dan spot yang dihasilkan lebih rendah dari standar catekin.

5.6 Identifikasi Gugus Fungsi dengan FTIR

Hasil analisis isolat catekin dari teh hijau menggunakan Spektrofotometer Inframerah (FTIR) memberikan serapan-serapan pada daerah bilangan gelombang (cm^{-1}) yang dapat dilihat pada **Gambar 19** berikut.



Gambar 19. Hasil Analisis Katekin dengan FTIR

Dari hasil spektra pada analisis senyawa hasil isolasi menggunakan Spektrofotometer Inframerah (FTIR) menghasilkan serapan-serapan pada daerah bilangan gelombang yang dapat diinterpretasikan pada **Tabel 5** berikut ini.

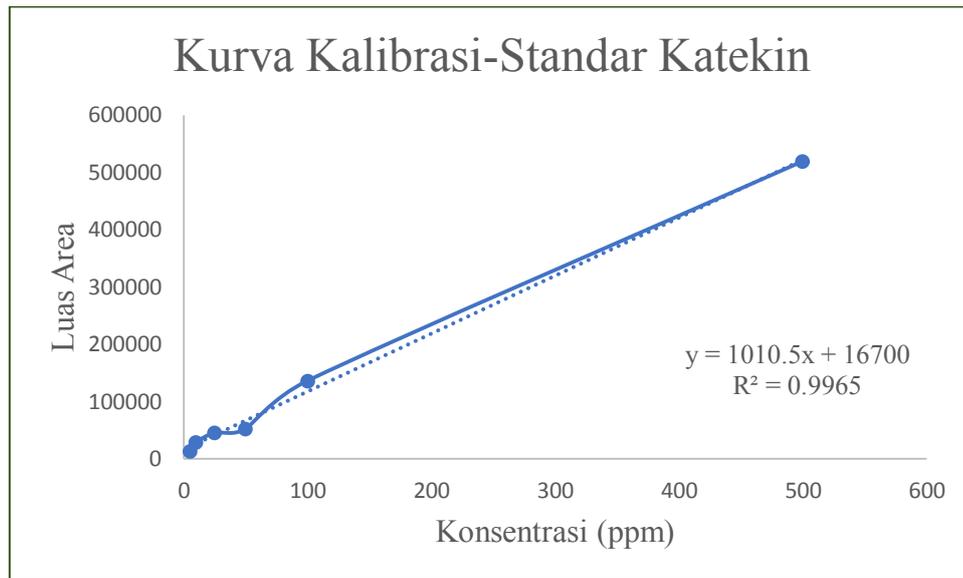
Tabel 5. Interpretasi Spektra FTIR

Gugus Fungsi	Intensitas	Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)	
		Teoritik	Hasil FTIR
O-H	Lebar	3000-3700	3422
C=C aromatic	Tajam	1500-1675	1638,88
-CH ₂ -	Sedang	1400-1475	1417,03
C-O	Sedang	1000-1300	1280,43

Sebelum proses identifikasi menggunakan spektroskopi FTIR, sampel dibuat pellet terlebih dahulu. Analisis dengan spektrofotometer FTIR ini memberikan spektrum berupa pita-pita serapan yang karakteristik untuk gugus-gugus fungsional tertentu pada sampel yang diukur. Spektra yang dihasilkan dari identifikasi sampel ini mengandung gugus fungsional C=C aromatik dengan serapan 1638,88 cm⁻¹, gugus O-H pada serapan 3422 cm⁻¹ (lebar). Pada bilangan gelombang 3422 cm⁻¹ dengan puncak lebar menunjukkan adanya vibrasi ulur dari O-H. Bilangan gelombang 1280,43 cm⁻¹ dengan puncak sedang menunjukkan adanya vibrasi ulur C-O eter, Berdasarkan hasil analisa Spektrum Inframerah (FTIR), bahwa semua gugus fungsi yang terdapat dalam spektrum tersebut menunjukkan karakteristik gugus fungsi yang pada umumnya terdapat di dalam senyawa flavonoid (katekin). Hasil tersebut sesuai dengan hasil karakterisasi yang dilakukan oleh Geng et al., (2016), yang membuktikan bahwa standar katekin memiliki serapan pada 3372 cm⁻¹ yang merupakan gugus O-H (hidroksil), serapan pada bilangan gelombang 1613, 1518, 1460 cm⁻¹ yang menunjukkan gugus fenil dan mengandung gugus C-O pada bilangan gelombang 1144 cm⁻¹.

5.7 Analisis katekin dengan HPLC

Penetapan kadar katekin menggunakan HPLC dilakukan menggunakan metode kurva kalibrasi. Standar katekin dibuat dengan konsentrasi 5, 10, 25, 50, 100, 250, dan 500 ppm dan dilakukan analisis dengan system isokratik menggunakan eluen 75% asam asetat : 25% asetonitril. Hasil luas area yang diperoleh diplotkan dengan konsentrasi dan dihasilkan kurva kalibrasi standar sebagai berikut.



Gambar 20. Kurva Kalibrasi Standar Katekin

Berdasarkan persamaan $y=1010,5x + 16700$ dengan nilai linearitas 0,9965 diperoleh hasil kadar katekin pada konsentrasi 2500 ppm sebesar 129,99 ppm (5,2%) dan pada konsentrasi 5000 ppm diperoleh hasil kadar katekin sebesar 451,17 (9,02%) ppm. Berdasarkan teori, kandungan total katekin pada daun teh hijau segar berkisar antara 13,5-31% dari berat daun teh kering (Towaha J, 2013). Kandungan katekin yang dihasilkan belum sesuai kadar secara teoritik, tetapi hampir mendekati. Hal ini dikarenakan proses isolasi katekin melalui beberapa tahap pemisahan, yang kemungkinan pada tahap sebelumnya terdapat senyawa katekin yang belum terekstrak dengan baik dan masih tercampur pada fraksi-fraksi lain pada saat kolom serta adanya sifat katekin yang mudah terurai oleh oksigen dan cahaya. Kromatogram hasil analisa HPLC menunjukkan waktu retensi dan profil isolat katekin yang sama dengan baku standar katekin, memperkuat hipotesa bahwa benar senyawa yang didapat adalah katekin.

5.8 Uji Kepekaan *Mycobacterium tuberculosis* terhadap Antibakteri Teh Hijau dan Obat Antituberkulosis

Tujuan dari uji ini adalah untuk menentukan kepekaan bakteri *Mycobacterium tuberculosis* terhadap senyawa antibakteri dari isolat dan ekstrak teh hijau serta Obat antituberkulosis (OAT) sebagai pembanding dengan menggunakan instrumen BACTEC MGIT 960. Metode BACTEC MGIT 960 ini

dipilih karena memiliki beberapa keuntungan, antara lain: mudah digunakan, dengan kapasitas yang tinggi, full otomatis, dimonitor secara terus menerus, menghindari dihasilkannya limbah radiometrik berbahaya seperti pada metode lain, serta memerlukan waktu yang lebih cepat dibandingkan dengan menggunakan metode konvensional dengan media Lowenstein-Jensen (LJ) yang membutuhkan waktu 2-4 minggu (Huang, 2002).

Uji kepekaan obat dengan MGIT 960 SIRE secara umum membutuhkan waktu selama 4-13 hari. Dalam penelitian ini, dibutuhkan waktu 12 hari untuk memperoleh hasil kepekaan. Penandaan instrumen telah selesai dalam analisis apabila *Growth Control* (GC) telah mencapai nilai *Growth Unit* 400. *Growth Control* merupakan kontrol pembanding strain H37Rv yang digunakan untuk meningkatkan keakuratan hasil uji. Saat GC mencapai 400, nilai GU sampel uji diambil instrument dengan mencetak pelaporan hasil *Drug Susceptibility Test* (DST) dan hasilnya diinterpretasikan secara manual.

Pembacaan hasil resisten atau sensitif tidak secara otomatis dibaca oleh alat, harus dianalisis secara manual dengan melihat nilai *Growth Unit* (GU) yang dikeluarkan oleh alat. Jika nilai GU pada tabung yang mengandung obat mencapai >100, Ketika nilai *Growth Unit* pada GC mencapai 400, maka hasilnya adalah resisten. Jika nilai *Growth Unit* pada tabung yang mengandung obat mencapai ≤100, Ketika nilai *Growth Unit* pada GC 400, maka hasilnya adalah sensitif (*susceptible*) (Rodrigues, 2008).

Berikut hasil uji kepekaan MTB H37Rv terhadap OAT dan sampel uji yang diperoleh setelah 12 hari:

Tabel 6. Hasil Uji Kepekaan MTB terhadap Obat Antituberkulosis

OAT	<i>Growth Unit</i>	Keterangan
<i>Growth Control</i>	400	Resisten
Streptomisin 1 µg/mL	400	Resisten
Moksifloksasin 1 µg/mL	0	Sensitif
Levofloksasin 1 µg/mL	0	Sensitif

Hasil uji kepekaan bakteri MTB terhadap beberapa obat antibiotik menunjukkan hasil kepekaan yang berbeda-beda. Pada antibiotik streptomisin dan rifampisin menunjukkan bahwa bakteri MTB resisten terhadap keduanya. Hal ini karena adanya mutasi pada subunit A (gen *gyr A*) pada DNA gyrase. Sementara pada antibiotik moksifloksasin dan levofloksasin masing-masing sensitif terhadap bakteri MTB H37Rv. Berdasarkan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Huang (2002) tentang uji kepekaan MTB terhadap obat antituberkulosis lini pertama. Dari data yang tersedia, menunjukkan bahwa hasil uji kepekaan bakteri H37Rv sensitif terhadap OAT streptomisin (82,6%). Dibandingkan dengan penelitian ini, terdapat perbedaan hasil uji kepekaan dengan penelitian Huang (2002), dikarenakan uji kepekaan pada penelitian ini hanya dilakukan terhadap satu isolat H37Rv, sedangkan pada penelitian sebelumnya menggunakan 47 isolat bakteri yang diuji terhadap streptomisin, sehingga keakuratannya lebih tinggi. Penelitian lain juga dilakukan oleh Lin (2009) yang membuktikan uji kepekaan isolat MTB lini kedua terhadap obat antituberkulosis, salah satunya yaitu levofloksasin dan hasilnya dari 117 isolat bakteri, 89 isolat (76,1%) sensitif terhadap levofloksasin. Hal ini sesuai dengan penelitian ini, karena diperoleh hasil sensitif terhadap levofloksasin.

Selanjutnya dilakukan uji kepekaan MTB terhadap sampel uji dan diperoleh data sebagai berikut:

Tabel 7. Hasil Uji Kepekaan MTB terhadap Sampel Uji

Sampel Uji	<i>Growth Unit</i>	Keterangan
Growth Control	400	Resisten
ekstrak 2500	400	Resisten
ekstrak 5000	400	Resisten
Isolat 2500	400	Resisten
Isolat 5000	400	Resisten

Sedangkan hasil interpretasi dari analisis menggunakan BACTEC MGIT 960, menunjukkan bahwa bakteri MTB resisten terhadap sampel ekstrak pada konsentrasi 2500 ppm dan 5000 ppm maupun isolat 2500 ppm dan 5000 ppm

dengan nilai *Growth Unit* masing-masing 400. Jika dibandingkan dengan nilai GC yang memiliki nilai *Growth Unit* yang sama yaitu 400, maka dapat dipastikan bahwa pada konsentrasi tersebut, ekstrak maupun isolat teh hijau belum cukup kuat dalam menghambat ataupun membunuh pertumbuhan bakteri *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Hal ini dapat disebabkan karena penggunaan konsentrasi sampel uji yang belum bervariasi, sehingga belum dapat diketahui konsentrasi kritis yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri MTB H37Rv. Selain itu, perlu adanya replikasi pengujian, karena pada umumnya suatu penelitian mengenai obat, memerlukan beberapa data untuk menunjang keakuratan hasil uji kepekaan obat, khususnya obat antituberculosis. metode ini digunakan untuk obat yang tersedia dalam bentuk murni, seperti isoniazide, ofloxacin (OFX), ethionamide (ETH) dan asam para-amino salisilat (PAS), sedangkan penelitian ini masih menggunakan ekstrak dan isolat yang belum murni, sehingga kemungkinan mempengaruhi hasil kepekaan. serta belum adanya referensi terkait uji kepekaan terhadap bahan alam, sehingga hasil uji kepekaan ini belum optimal.

Penelitian terkait uji aktivitas antituberculosis dilakukan oleh Mirzautika (2020), yaitu menguji epigallocatechin gallate yang merupakan turunan katekin terhadap *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv menggunakan metode *Broth Dilution* dengan media *Middlebrook 7H9* mampu menghasilkan persentase hambatan terhadap MTB sebesar 90%. Hasil tersebut memiliki perbedaan dengan penelitian ini, karena metode yang digunakan berbeda dalam uji aktivitas terhadap bakteri MTB dan sampel yang digunakan dalam penelitian ini masih belum murni, sedangkan pada penelitian sebelumnya digunakan sampel dengan kemurnian 98%.

5.9 Uji Aktivitas Teh Hijau terhadap Bakteri Patogen

5.9.1 Pembuatan Media Pertumbuhan Bakteri

Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah nutrisi agar, *nutrient broth*, dan *mueller hinton broth* (MHB). Media tersebut merupakan media umum yang biasa digunakan karena mendukung pertumbuhan bakteri dengan nutrisi yang dikandungnya.

Pembuatan media dilakukan dengan melarutkan media dalam erlenmeyer

dengan pelarut akuades karena memiliki kelarutan yang baik dalam akuades. Selanjutnya dilakukan penggojokkan untuk mempercepat pelarutan. Pada mulut erlenmeyer disumbat dengan kapas untuk meminimalisasi kontaminasi. Setelah itu, media disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 2 jam. Sterilisasi tersebut bertujuan untuk mencegah adanya mikroorganisme yang tidak diinginkan tumbuh pada media yang sudah dibuat. Prinsip kerja autoklaf adalah dengan menggunakan suhu dan tekanan tinggi yang akan membentuk uap air yang kemudian akan mendesak udara yang mengisi autoklaf sehingga udara dalam autoklaf akan diganti oleh uap yang menyebabkan tekanan udara di dalam naik. Pada saat tercapai tekanan dan suhu yang sesuai, maka sel-sel resisten yang diproduksi oleh bakteri akan mati.

5.9.2 Peremajaan Bakteri

Sebelum digunakan untuk uji aktivitas, bakteri yang akan digunakan diremajakan terlebih dahulu karena bakteri berasal dari lemari pendingin yang berada dalam kondisi inaktif, sehingga peremajaan bakteri ini bertujuan untuk memperoleh bakteri yang aktif dan memperbanyak bakteri yang tumbuh. Media yang digunakan dalam peremajaan bakteri adalah media NB yang mengandung nutrisi bagi pertumbuhan bakteri.

Masing-masing bakteri dilakukan subkultur dengan ditumbuhkan pada media Nutrient Broth pada tabung reaksi. Diinkubasi pada inkubator selama 24 jam pada suhu 37 °C. Inkubasi bakteri dilakukan selama 24 jam karena pada waktu tersebut bakteri dimungkinkan telah berada pada fase logaritmik atau eksponensial, dimana pada fase ini bakteri mengalami pembelahan secara konstan dan jumlah sel semakin meningkat. Sedangkan suhu yang digunakan 37 °C karena pada suhu tersebut bakteri dapat tumbuh secara optimal.

5.9.3 Uji Aktivitas Antibakteri Isolat dan Ekstrak Teh Hijau terhadap Bakteri *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, dan *Streptococcus pyogenes*

Uji aktivitas antibakteri terhadap beberapa bakteri patogen ini dilakukan menggunakan metode difusi cakram. Metode cakram digunakan karena memiliki kelebihan yaitu cepat, mudah dan murah karena tidak memiliki alat khusus.

Kelemahannya adalah zona bening yang dihasilkan dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti kondisi inkubasi, ketebalan medium, inokulum, predifusi dan preinkubasi.

Sampel yang akan diuji antibakteri adalah ekstrak dan isolat teh hijau yang dibuat dengan variasi konsentrasi 2500 ppm dan 5000 ppm. Penggunaan beberapa konsentrasi tersebut dimaksudkan agar dapat dibuktikan ada tidaknya efek farmakologi yang dimiliki sampel pada konsentrasi yang berbeda. Uji diameter zona hambat dengan metode difusi cakram ini dilakukan dengan cara kertas cakram sebagai media untuk menyerap bahan antimikroba dijenuhkan ke dalam bahan uji. Setelah itu kertas cakram diletakkan pada permukaan media agar yang telah diinokulasi dengan biakan mikroba uji, kemudian diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 37 °C. Ada tidaknya pertumbuhan bakteri diamati dengan melihat zona bening di sekitar kertas cakram. Semakin luas zona bening, maka semakin besar daya antibakteri yang dimiliki oleh suatu bahan dalam menghambat pertumbuhan bakteri.

Hidayat (2015) menyatakan dalam laporannya bahwa klasifikasi pengukuran daya hambat antibiotik dan antibakteri dengan menggunakan metode Davis Stout dapat dibedakan menjadi beberapa kategori:

Tabel 7. Klasifikasi Respon Daya Hambat

Diamter Zona Hambat (mm)	Respon Hambatan Pertumbuhan
≤5	Lemah
5-10	Sedang
10-20	Kuat
≥20	Sangat Kuat

Hasil uji aktivitas antibakteri senyawa katekin dapat dilihat bahwa ekstrak dan isolat dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* dan *Streptococcus pyogenes* yang dapat dilihat berdasarkan zona hambat yang diperoleh sebagai berikut :

Tabel 8. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Senyawa Katekin Teh Hijau

Sampel (ppm)	Zona Hambat (mm)			
	<i>K.pneumoniae</i>	<i>S.aureus</i>	<i>S.pyogenes</i>	<i>E.coli</i>
Ekstrak 2500	11	22	11	13
Ekstrak 5000	15	19	10	14
Isolat 2500	15	21	21	12
Isolat 5000	21	19	17	9
Ampisilin	10	8	15	10
Eritomisin	24	16	26	22

Berdasarkan hasil pengamatan diperoleh bahwa ekstrak maupun isolat teh hijau terhadap masing-masing bakteri memiliki aktivitas yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri dengan diameter zona hambat yang berbeda-beda. Pengamatan daya hambat sampel terhadap masing-masing bakteri memperlihatkan adanya pengaruh konsentrasi yang yang diberikan.

Pada bakteri *Klebsiella pneumoniae* menghasilkan zona hambat yang semakin besar seiring dengan semakin tingginya konsentrasi baik pada ekstrak maupun isolat teh hijau. Pada isolat 2500 ppm, 5000 ppm dan ekstrak 2500, 5000 ppm diperoleh zona hambat berturut-turut 11, 15, 15, 21 mm. Zona hambat tersebut bersifat bakteriostatik, yaitu hanya menghambat pertumbuhan, tetapi tidak membunuh. Hasil zona hambat pada penelitian ini jika dibandingkan dengan kontrol positif ampisilin dan eritomisin, maka memiliki aktivitas antibakteri lebih baik dari ampisilin, tetapi kurang baik daripada eritomisin. Diameter zona hambat tertinggi terhadap bakteri *K. pneumoniae* berasal dari isolat 5000 ppm yaitu 21 mm yang tergolong zona hambat sangat kuat. Uji aktivitas juga dilakukan oleh Ananthi & Giri (2018), ekstrak alami dan ekstrak komersial teh hijau memiliki aktivitas antibakteri yang sangat kuat terhadap *Klebsiella pneumoniae* dengan dihasilkan diameter zona hambat 22 ± 0.8 mm untuk ekstrak alami dan $21 \pm 1,5$ mm untuk ekstrak komersial. Sementara menurut Dhanam, dkk (2016), senyawa saponin, fenol, terpenoid, glikosida, alkaloid, flavonoid, dan tannin dalam ekstrak etanol daun pepaya tidak memiliki daya hambat terhadap bakteri *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883. Sementara itu Trihandayani, dkk (2016), menyatakan bahwa hasil ekstrak daun salam memiliki aktivitas terhadap *K. pneumoniae* dengan daya hambat

tertinggi pada konsentrasi 7% sebesar $14,685 \pm 0,04$ mm. Jika dibandingkan dengan hasil penelitian ini, isolat katekin memiliki aktivitas yang lebih tinggi dari ekstrak daun papaya maupun daun salam terhadap bakteri *Klebsiella pneumoniae*.

Selanjutnya zona hambat yang diperoleh juga menunjukkan bahwa sampel teh hijau memiliki efektifitas terhadap bakteri *S. aureus* masing-masing ekstrak 1000 ppm dan 2500 ppm serta fraksi 1000 ppm dan 2500 ppm menghasilkan zona hambat berturut-turut sebesar 22 mm, 19 mm, 21 mm, dan 19 mm. Zona hambat tersebut bersifat menghambat (bakteriostatik), tetapi antibakteri ini juga bersifat bakteriosida, yaitu dapat membunuh sel bakteri dengan dihasilkannya zona bening, namun diameter yang dihasilkan lebih kecil. Diameter zona hambat terhadap bakteri *S. aureus* memiliki aktivitas yang lebih baik pada konsentrasi yang lebih rendah baik pada ekstrak maupun pada fraksi. Hal ini dapat disebabkan karena adanya pertumbuhan bakteri yang tidak merata dan juga dapat disebabkan karena dengan adanya konsentrasi yang rendah kemungkinan senyawa lebih mudah berdifusi pada kertas dibandingkan pada konsentrasi yang lebih pekat. Pembentukan zona hambat pada uji aktivitas antibakteri ini dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti suhu inkubasi, waktu inkubasi, dan kepekatan mikroba (Jawetz, 2008). Berdasarkan kelompok respon daya hambat, zona hambat paling tinggi terhadap bakteri *S. aureus* terdapat pada ekstrak 1000 ppm yang tergolong zona hambat sangat kuat dan memiliki aktivitas lebih baik dari eritromisin, tetapi kurang baik daripada ampisilin.

Uji aktivitas antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri *S. pyogenes* didapatkan hasil pengukuran zona hambat yang berbeda setiap konsentrasi, dimana pada konsentrasi rendah memiliki aktivitas lebih, baik pada isolat maupun ekstrak. Aktivitas penghambatan tertinggi terdapat pada isolat 2500 ppm yaitu 21 mm, yang tergolong zona hambat sangat kuat dan lebih baik dari antibiotik ampisilin. Aktivitas antibakteri ini dalam menghambat *S. pyogenes* bersifat bakteriosida, yaitu dapat membunuh bakteri karena dihasilkan zona bening. Berdasarkan penelitian Anjani, dkk (2016), ekstrak murni buah kersen dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes* sebesar 28,0 mm. Perolehan daya hambat tersebut menunjukkan aktivitas yang lebih baik dibandingkan isolat teh

hijau, dikarenakan ekstrak buah kersen lebih banyak mengandung senyawa aktif yang dapat menghambat pertumbuhan *S. pyogenes*

Uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri *E. coli* diperoleh hasil diameter zona hambat dari ekstrak konsentrasi 2500 ppm, 5000 ppm, fraksi 2500 ppm, dan fraksi 5000 ppm berturut-turut sebesar 13 mm, 14 mm, 12 mm dan 9 mm. Seluruh kelompok konsentrasi ekstrak maupun fraksi menunjukkan adanya efek daya hambat terhadap bakteri *E. coli*. Diameter zona hambat tersebut apabila dikategorikan berdasarkan klasifikasi daya hambat pertumbuhan bakteri, maka pada ekstrak 5000 ppm dikategorikan sedang dan merupakan diameter zona hambat tertinggi yang memiliki aktivitas lebih baik dari ampisilin, tetapi kurang dari aktivitas antibiotik eritromisin.

Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Amelia, dkk (2012), yang menyatakan bahwa ekstrak teh hijau dengan konsentrasi 10, 30, 50, 70, 100% memiliki aktivitas terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus*. Akan tetapi, tidak diperoleh perbedaan efektivitas antibakteri ekstrak teh hijau terhadap *S. aureus* dan *E. coli* ($p < 0,05$). Menurut penelitian yang dilakukan oleh Zeniusa dan Ramadhian (2017), menunjukkan bahwa pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dapat dihambat dengan ekstrak etanol teh hijau 96%, pada konsentrasi 90% dan 100% menunjukkan peningkatan diameter zona hambat yaitu 19,40 mm (Zeniusa & Ramadhian, 2017).

Aktivitas penghambatan ekstrak dan isolat daun teh hijau terhadap beberapa bakteri patogen tersebut disebabkan karena adanya senyawa-senyawa kimia yang terkandung dalam daun teh hijau, khususnya senyawa katekin dan senyawa-senyawa lain seperti tanin, flavonoid. Sedangkan bakteri dalam setiap selnya dikelilingi membran sitoplasma yang tersusun secara dominan oleh ergosterol dan fosfolipid. Mekanisme penghambatan bakteri ini, melalui perusakan membrane sitoplasma, dimana senyawa katekin akan melepaskan ion H^+ kemudian menyerang gugus hidrofilik (gugus hidroksi dan fosfat) pada permukaan membrane sel. Gugus hidroksi pada molekul ergosterol yang mengadakan ikatan hidrogen tidak mampu mempertahankan ikatan dan kedudukannya. Membran sel tidak mampu menahan tekanan dari dalam, akibatnya sitoplasma dalam sel akan menembus keluar. Selain

itu, pada molekul fosfolipid ion H^+ dari senyawa katekin akan menyerang gugus polar (gugus fosfat) sehingga molekul fosfolipid akan terurai menjadi gliserol, asam karboksilat, dan asam fosfat. Hal ini mengakibatkan fosfolipid tidak mampu mempertahankan bentuk membran sitoplasma akibatnya akan bocor sehingga zat-zat untuk metabolisme sel bakteri akan terbuang keluar dan bakteri akan mati (Endarini, 2021).

Berdasarkan hasil uji aktivitas antibakteri terhadap 4 bakteri patogen, diperoleh zona hambat tertinggi pada bakteri *Streptococcus aureus*. Hal ini dapat dikarenakan bakteri *S. aureus* merupakan bakteri gram positif yang memiliki struktur dinding sel yang lebih sederhana, yaitu berlapis tunggal dengan kandungan lipid yang rendah (1-4%) sehingga memudahkan bahan bioaktif masuk ke dalam sel. Struktur dinding sel bakteri gram negatif lebih kompleks, yaitu berlapis tiga terdiri atas lipidprotein, lipopolisakarida dan sedikit peptidoglikan (5-10%). lapisan lipopolisakarida ini memperkuat kekakuan/rigiditas dinding sel bakteri gram negatif melalui ikatan silang kationik intermolekuler dan menjadi penghalang masuknya senyawa bioaktif antibakteri (Holst, 2011). Hal inilah yang mengakibatkan bakteri gram negatif menjadi lebih kokoh sehingga sulit ditembus oleh senyawa antibakteri (Septiani et al., 2017).

5.10 Perbandingan Hasil Uji Aktivitas Antibakteri terhadap *M. tuberculosis*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. pyogenes* dan *E.coli*

Hasil uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri *M. tuberculosis* memberikan hasil resisten terhadap ekstrak dan isolat teh hijau, artinya bakteri MTB memiliki kemampuan dalam menahan efek obat, sehingga pertumbuhan bakteri tersebut tidak dapat dihambat atau dibunuh oleh adanya ekstrak ataupun isolat teh hijau, sedangkan isolat dan ekstrak teh hijau memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *streptococcus pyogenes* dan *Escherichia coli*. Perbedaan hasil tersebut disebabkan karena metode yang digunakan dalam uji aktivitas terhadap bakteri *M. tuberculosis* menggunakan metode BACTEC MGIT 960, sedangkan terhadap bakteri *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, dan *E. coli* menggunakan metode difusi cakram. Selain itu, *M.*

tuberculosis merupakan bakteri tahan asam, yaitu bakteri yang tidak dapat digolongkan sebagai bakteri Gram positif maupun bakteri Gram negatif yang memiliki struktur dinding sel unik dibandingkan bakteri lain sehingga memiliki kekuatan terhadap komponen berbahaya ataupun obat yang mengakibatkan keganasan bakteri ini. Kelebihan tersebut disebabkan karena kandungan lipid yang tinggi pada dinding selnya yaitu lebih dari 60% (Todar, 2008). Sedangkan bakteri gram positif (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*) kandungan lipidnya hanya 1-4% dan bakteri gram negatif (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*) sekitar 11-22% (Helmiyati & Nurahman, 2010).

BAB VI KESIMPULAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil yang telah diperoleh dalam penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa :

1. Senyawa katekin dapat diekstraksi dengan metode maserasi dengan pelarut yang paling efektif yaitu etanol selama 60 menit
2. Hasil identifikasi senyawa katekin diperoleh sebagai berikut :
 - Reagen FeCl_3 , pada ekstrak teh hijau positif mengandung katekin ditandai warna hijau kehitaman
 - UV-Vis, hasil identifikasi katekin dari ekstrak teh hijau paling banyak terdapat pada ekstrak dengan pelarut etanol selama 60 menit
 - FTIR, hasil isolat mengandung gugus fungsi O-H, C=C, C-O, C-H aromatik yang merupakan karakteristik katekin
 - HPLC, kadar katekin pada isolat teh hijau dengan konsentrasi 2500 ppm sebesar 129,99 ppm (5,2%) dan pada konsentrasi 5000 ppm sebesar 451,17 ppm (9,02%).
3. Hasil uji aktivitas antibakteri senyawa katekin resiten terhadap *Mycobacterium tuberculosis* dengan metode BACTEC MGIT 960 dan memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* dan *Escherichia coli* menggunakan metode kertas cakram, dengan aktivitas tertinggi terhadap *Staphylococcus aureus*

6.2 Saran

1. Perlu dilakukan isolasi katekin pada bagian lain dari tanaman teh hijau, seperti batang, akar dan bunga
2. Perlu dilakukan pemurnian senyawa katekin agar proses identifikasi dan uji bakteri lebih spesifik terhadap senyawa target
3. Perlu dilakukan uji aktivitas antibakteri dari senyawa katekin terhadap bakteri lain dan menggunakan metode yang berbeda

DAFTAR PUSTAKA

- Amelia, R., Sudomo, P., dan Widasari, L., 2012, Perbandingan Uji Efektivitas Ekstrak Teh Hijau (*Camellia sinensis*) sebagai Anti Bakteri terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* Secara In Vitro, *Bina Widya*, 23(4), 177-182.
- Amin, Z. & Bahar, A., 2009. *Pengobatan tuberculosis mutakhir*. Dalam: Sudoyo AW, Setiyohadi B, Alwi I, Simadibrata M, Setiati S, editor. Buku ajar penyakit dalam jilid III. Edisi ke-5. Jakarta: Interna Publishing; 2009. hlm. 2240-8.
- Anderson, K.F., Lonsway, D.R. & Rasheed, J.K., 2007. Evaluation of Methods to Identify the *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol*, 45, pp.2723-5.
- Araghizadeh, A., Kohanteb, J. dan Fani, M. M., 2013. Inhibitory Activity of Green Tea (*Camellia sinensis*) Extract on Some Clinically Isolated Cariogenic and Periodontopathic Bacteria. *Medical Principles and Practice*, 22, 368-372.
- Archana, S. dan Abraham, J., 2011. Comparative Analysis of Antimicrobial Activity of Leaf Extracts from Fresh Green Tea, Commercial Green Tea and Black Tea on Pathogens. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 01(08), 149 -152.
- Beesley, T., Gascoyne, N. & KnottHunziker, V., 1983. The inhibition of Class C β -Lactamases by Boronic Acids. *Biochem J*, 209, pp.229-33.
- Bonang, G., 1992, *Mikrobiologi untuk Profesi Kesehatan Edisi 16*, Jakarta, Buku Kedokteran EGC.
- Coban, A. Y., Cihan, C. C., & Bilgin, K., 2006. Blood Agar for Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* Against First-Line Drugs. *Int J Tuberc Lung Dis*, 10(9), 450–453.
- Dettlaff, K., Stawny, M., Ogrodowczyk, M., et al., 2017, Formulation and Characterization of Eggc for The Treatment of Superficial Bladder Cancer, *International Journal Of Molecular Medicine*, 40: 329-336.

- Dirjen POM, 2014. *Farmakope Indonesia Edisi V*. Jakarta: Depkes RI.
- Ediningsih & Rahayuningsih, S., 2019. Ekstraksi, Isolasi, Karakterisas dan Uji Aktivitas Antioksidan Senyawa Katekin Gambir (*Uncaria gambir* (Hunter). *Al-Kimia*, 7(2), 177-188.
- Ernyasih, 2012, Hubungan Iklim, (Suhu Udara, Curah Hujan, Kelembaban dan Kecepatan Angin) dengan Kasus Diare di DKI Jakarta Tahun 2007-2011, *Tesis*, Depok, Universitas Indonesia.
- Fatima, Z., Hameed, S. & Islam, N., 2013. Green Tea Polyphenol (EGCG) is A Better Inhibitor of TNF- α and MTB 85B Antigen in Human Monocytes Than Known Antioxidants and Antibiotics. *Teh Journal of Infectious Diseases*, 112, 131-137.
- Faustini, A., Hall, A. J. & Perucci, C. A., 2006. Risk Factors for Multidrug Resistant Tuberculosis in Europe: A Systematic Review. *Thorax*, 61, 158-163.
- Gülbay, B. E., Gürkan, Ö. U., Yıldız, Ö. A., Önen, Z. P., Erkekol, F. Ö., Baççioğlu, A. & Acıcan, T. 2006. Side Effects Due to Primary Antituberculosis Drugs During teh Initial Phase of Tehrapy in 1149 Hospitalized Patients for Tuberculosis. *Respiratory Medicine*, 100(10), 1834-1842.
- Herwin & Maryam, 2017. Aktivitas Antimikroba Ekstrak Daun Teh Hijau (*Camellia sinensis*) dan Jati Belanda (*Guazuma ulmifolia* Lamk.) terhadap Mikroba Patogen secara Bioautography-Tlc.
- Hidayat, H., 2015. Identifikasi Morfologi dan Uji Aktivitas Antimikroba Terhadap Bakteri *Escherichia coli* Dari Fermentasi Buah Markisa (*Passiflora sp.*). *EKSAKTA: Journal of Sciences and Data Analysis*, 15(1-2), 75–84.
- Ibrahim, A. M. & Adijuwana, H., *Teknik Pemisahan dalam Analisis Biologis*. Bogor : Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Pusat.
- Jawetz, Melnick, Adelberg, 2007. *Mikrobiologi Kedokteran*. (H Hartanto, C Rachman, A Dimanti, A Diani). Jakarta: EGC.
- Kemenkes, 2017. *Modul Pelatihan Pencegahan Pengendalian Penyakit TB*. Jakarta: Direktorat Jenderal Pencegahan dan Pengendalian Penyakit Menular Kemenkes RI.

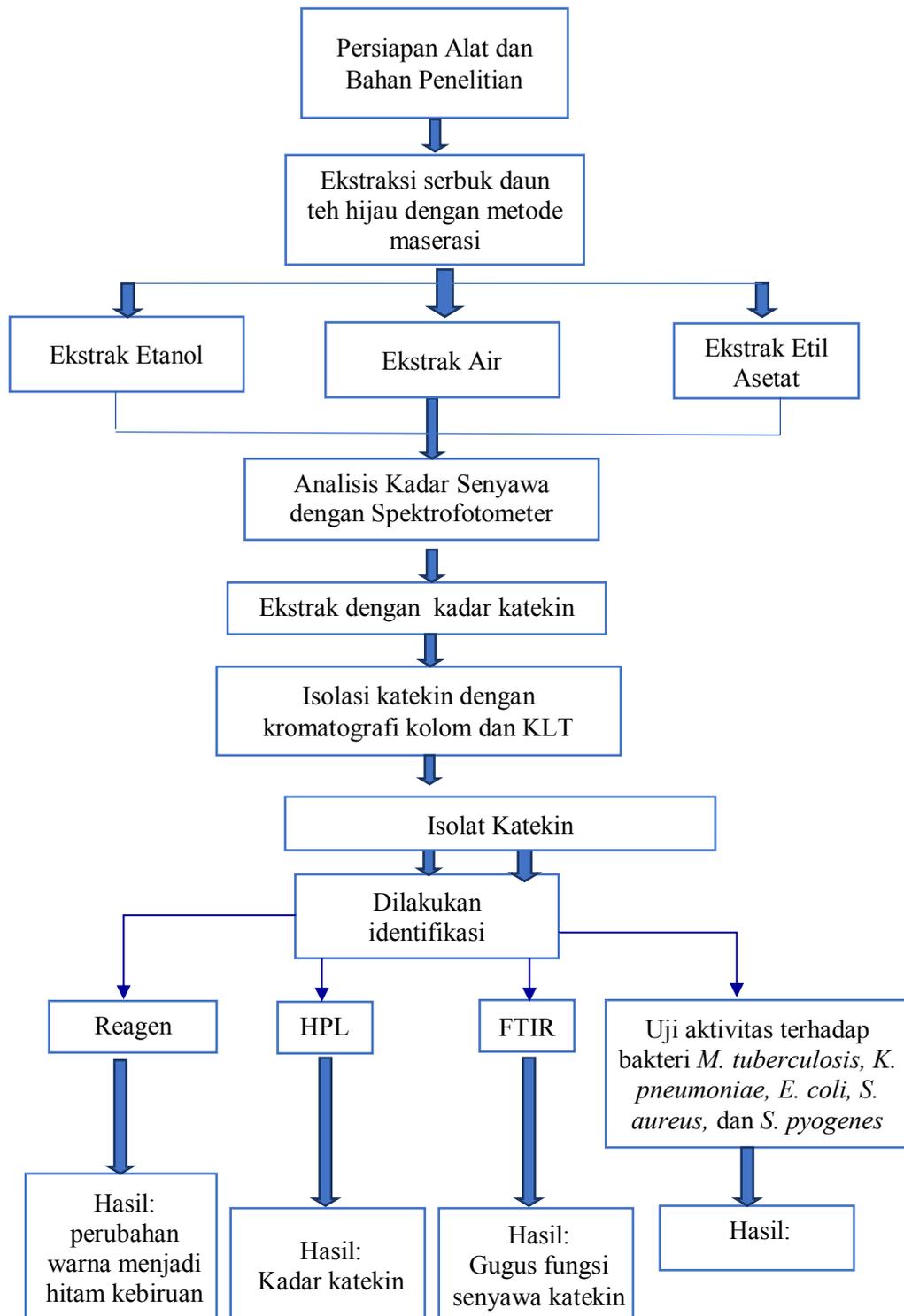
- Khomsan & Ali, 2006, *Solusi Makanan Sehat*. Jakarta: Raja Grafindo Persada.
- Kim, S. 2015. Optimal Diagnosis and Treatment of Group A *Streptococcal pharyngitis*. *Infection and Chemotherapy* Vol. 47(3). Pp. 202–204.
- Koech, K. R., Wachira, F. N., Ngure, R. M., Wanyoko, J. K., Bii, C. C., Karori, S. M. et al., 2013. Antimicrobial, synergistic and antioxidant activities of tea polyphenols. *Formatex*, 2(4), 971–81.
- Koresy, D., 2018, Efek Ekstrak Etanol The Hijau (*Camellia sinensis var. assamica*) sebagai Penghambat pembentukan Biofilm *Klebsiella pneumonia* secara in vitro, *Skripsi*, Malang, Universitas Brawijaya
- Lin, Y. L., IM. Juan., Y. L., Chen, Y. C., Liang and JK. Lin., 1996. Composition of Polyphenols in Fresh Tea Leaves and Associations of Their Oxygen-Radical Absorbing Capacity with Antiproliferative Actions in Fibroblast Cells. *J. Agric.Food Chem*, 44, 1387-1394.
- Long, B., Liang, S. Y., Koyfman, A. dan Gottlieb, M., 2019. Tuberculosis: a Focused Review for the Emergency Medicine Clinician. *American Journal of Emergency Medicine*, 38, 1014–1022.
- Mageed, M. J. & Saif, S.S.J., 2015. Antimicrobial Effects of Green Tea Extracts on *Porphyromonas gingivalis* (In Vitro Study). *Journal of Dental and Medical Sciences*, 14(10), 33-39.
- Mirzautika, A., Isnaeni, & Purwanto, D. A., 2020. Aktivitas Anti-*Mycobacterium tuberculosis* Kombinasi (-)-Epigallocatechin- Gallate (EGCG) dan Obat Antituberkulosis Lini Pertama. *Jurnal Kefarmasian Indonesia*, 10(1), 59-66.
- Mirzautika, A., Isnaeni, Purwanto, D.A., 2020, Aktivitas Anti-*Mycobacterium tuberculosis* Kombinasi (-)-Epigallocatechin-Gallate (EGCG) dan Obat Antituberkulosis Lini Pertama, *Jurnal Kefarmasian Indonesia*, 10(1), 59-66.
- Mulu, W., Mekonnen, D., Yimer, M., Admassu, A. & Abera, B., 2015. Risk Factors for Multidrug Resistant Tuberculosis Patients in Amhara National Regional State. *African Health Sciences*, 15(2), 368-377.
- Mutmainnah, 2017, Penentuan Suhu dan Waktu Optimum Penyeduhan Batang Teh Hijau (*Camelia sinensis L.*) terhadap Kandungan Antioksidan Kafein, Tanin dan Katekin, *Skripsi*, Makassar, Uin Alauddin Makassar.

- Nur, S., Rumpak, G., Mubarak, F., Aisyah, dkk., 2020, Identifikasi dan Penentuan Kadar Katekin dari Seduhan dan Ekstrak Etanol Produk Teh Hijau (*Camellia Sinensis* L) Komersial secara Spektrofotometri Uv-Visible, *Majalah Farmasi dan Farmakologi*, 24(1), 1-4
- Pawar, A., Jha, P., Chopra, M., Chaudhry, U. dan Saluja, D., 2020. Screening of Natural Compounds that Targets Glutamate Racemase of *Mycobacterium tuberculosis* Reveals teh Anti-Tubercular Potential of Flavonoids. *Scientific Reports*, 10(1), 1-12.
- Pratiwi, B., 2021, Ekstrak Teh Hijau (*Camellia sinensis* L.) Efektif Menghambat Pertumbuhan Bakteri (*Escherichia coli*), *Jurnal Penelitian Perawat Profesional*, 3(4), 693-698.
- Pratiwi, P., Alam, G., Rante, H. dan Massi, N., 2019. Aktivitas Anti *Mycobacterium tuberculosis* Strain H₃₇Rv dan MDR (*Multi Drug Resistant*) dari Ekstrak Rimpang *Curcuma mangga* Val. *Jurnal Farmasi Galenika*, 6 (1), 70 – 76.
- Rahardiyani, D., 2019. Antibacterial Potential of Catechin of Tea (*Camellia sinensis*) and Its Applications. *Food Research*, 3 (1), 1–6.
- Reygaert, W. C., 2014. Teh Antimicrobial Possibilities of Green Tea. *Front Microbiol*, 5, 1–8.
- Robinson & Trevor, 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. diterjemahkan oleh Prof. Dr. Kosasih Padmawinat. Bandung: Penerbit ITB.
- Santhosh, R. S. & Suriyanarayanan, B., 2014. Plants: A Source for New Antimycobacterial Drugs. *Planta Medica*, 80(1), 9-21.
- Saraswati, A., 2015. Efektivitas Ekstrak Daun Teh Hijau (*Camellia sinensis*) dengan NaOCL 2,5% terhadap Bakteri *Enterococcus faecalis* sebagai Alternatif Larutan Irigasi Saluran Akar. *Skripsi*. Makassar: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hasanuddin.
- Sowandi & Ami, 2016. *Petunjuk Praktikum Kimia Organik*. Surabaya.
- Steinmann, J., Buer, J., Pietschmann, T. & Steinmann, E., 2013. Anti- Infective Properties of Epigallocatechin- 3- Gallate (Egcg), A Component of Green Tea. *British Journal of Pharmacology*, 168(5), 1059-1073.
- Sudjadi, 1986. *Metode Pemisahan*. UGM Press: Yogyakarta.

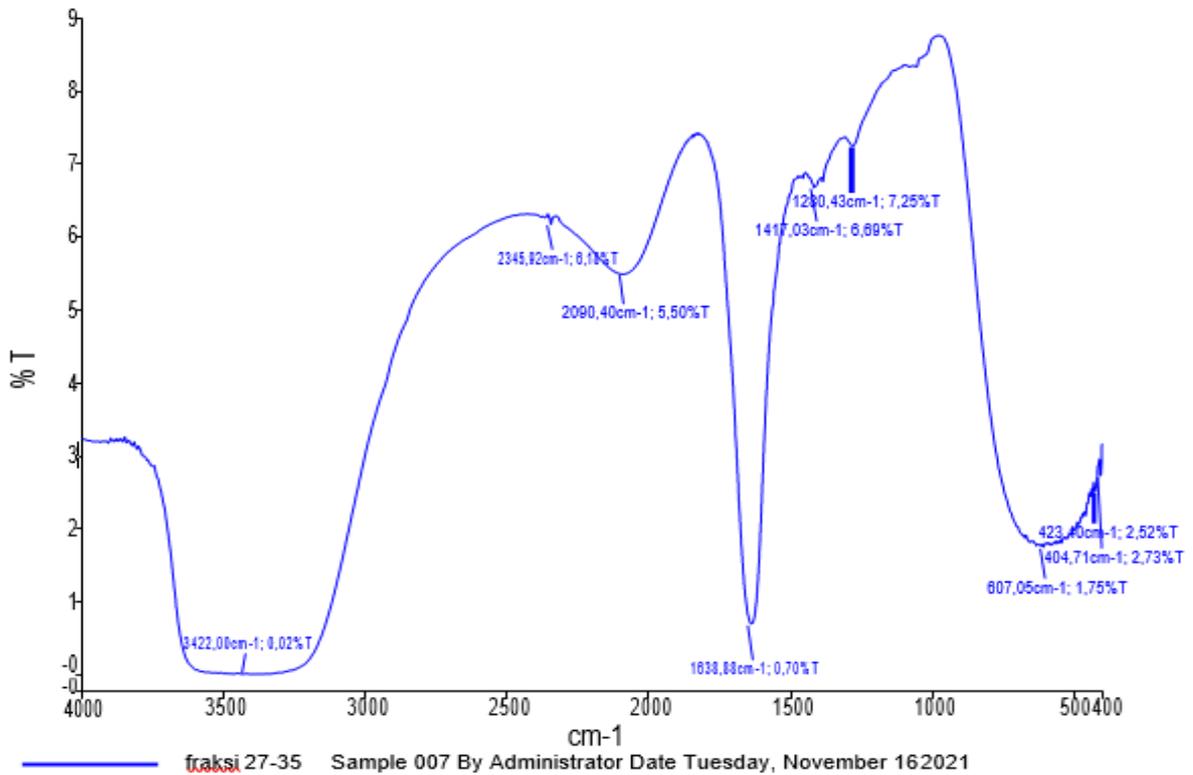
- Sudjatini, S., 2019. Optimasi Ekstraksi dan Penentuan Kandungan Katekin dalam Teh Hijau (*Camellia sinensis*) Menggunakan Metoda HPLC. *Agrotech Jurnal Ilmiah Teknologi Pertanian*, 2(1), 43-49.
- Sudoyo, A. W., 2006. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam*. Jilid II. Jakarta: Fakultas Kedokteran Indonesia.
- Sulaiman, T., 2011. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. diterjemahkan Padmawinata, K., Edisi IV. Bandung: ITB.
- Syah, A. A. N., 2006. *Taklukan Penyakit Dengan Teh Hijau*. Jakarta: Agro Media Pustaka.
- Velayati, A. A. & Parissa, F., 2016. *Atlas of Mycobacterium Tuberculosis*. London, United Kingdom: Academic Press.
- WHO, 2017. *Global Tuberculosis Report 2017*, Jenewa. www.who.int/gho/mortality_burden_disease/cause_death/top10/en/
- WHO, 2020. *Global Tuberculosis Report*. United States: World Health Organization.
- Zheng, et al., 2014. *Identification of Plant-Derived Natural Products as Potential Inhibitors of teh Mycobacterium tuberculosis Proteasome*. China: Department of Microbiology & Immunology, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine.
- Zumla, A., Nahid, P. & Cole, S. T., 2013. Advances in teh Development of New Tuberculosis Drugs and Treatment Regimens, *Nat. Rev. Drug Discov*, **12**, 388–404.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Skema Penelitian



Lampiran 2. Data Analisis FTIR



Source Spectra Results	
Spectrum Name	Number Of Peaks
fraksi 27-35	9

List of Peak Area/Height		
Peak Number	X (cm-1)	Y (%T)
1	3422	0,02
2	2345,92	6,18
3	2090,4	5,5
4	1638,88	0,7
5	1417,03	6,69
6	1280,43	7,25
7	607,05	1,75
8	423,4	2,52
9	404,71	2,73

Lampiran 3. Data HPLC



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 overheating 2. fraksi katekin mudah teroksidasi oleh udara dan penyimpanan dan penanganannya memerlukan suhu dingin atau menghindari overheating
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 only with 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 BSR-E, silahkan lakukan verifikasi pada dokumen elektronik yang dapat diunduh dengan melakukan scan QR Code

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.

Catechin operation conditions:

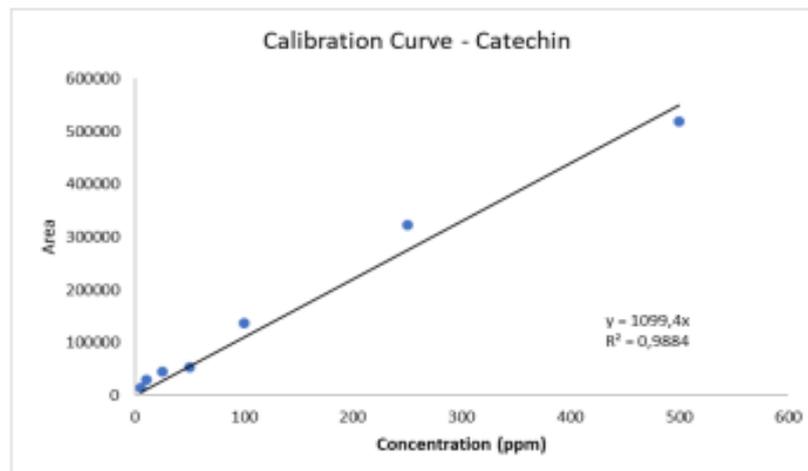
- Runtime: 30 min
- Flowrate: 1 mL min⁻¹
- Eluent: 75% acetic acid solution (0.3%): 25% Acetonitrile
- Wavelength: 254 nm
- Injection volume: 10 µL
- Column: ODS Hypersil 250 x 4.6 mm, 5 µm

Hasil Pengujian *Testing Results :*

Link URL *Url link* [copy paste link url]

Kurva kalibrasi larutan standar catechin

Conc. (ppm)	Ret. Time (min)	Area
5	14.258	13731
10	14.257	29400
25	14.272	45570
50	14.310	52607
100	14.329	136651
250	14.310	322351
500	14.294	519463



$$y = 1099.4x$$

Sample (ppm)	Area	Conc. (ppm)
2500	148057	134.67
5000	472607	429.88

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.



Analysis Report

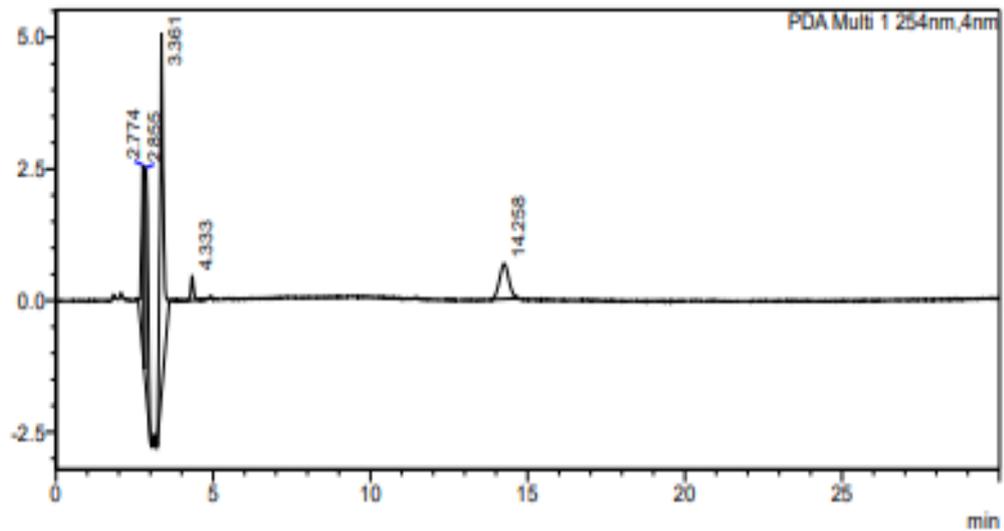
<Sample Information>

Sample Name : std_5 ppm
 Sample ID :
 Data Filename : std_5 ppm_18112021_001.lcd
 Method Filename : ELSA_Catechin.lcm
 Batch Filename : Chatechin.lcb
 Vial # : 1-1
 Injection Volume : 10 uL
 Date Acquired : 18/11/2021 13:41:46
 Date Processed : 18/11/2021 14:11:49

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	2.774	21652	3592	0.000			
2	2.855	28474	4094	0.000		V	
3	3.361	52575	6826	0.000			
4	4.333	2691	447	0.000			
5	14.258	13731	665	0.000			
Total		119124	15624				

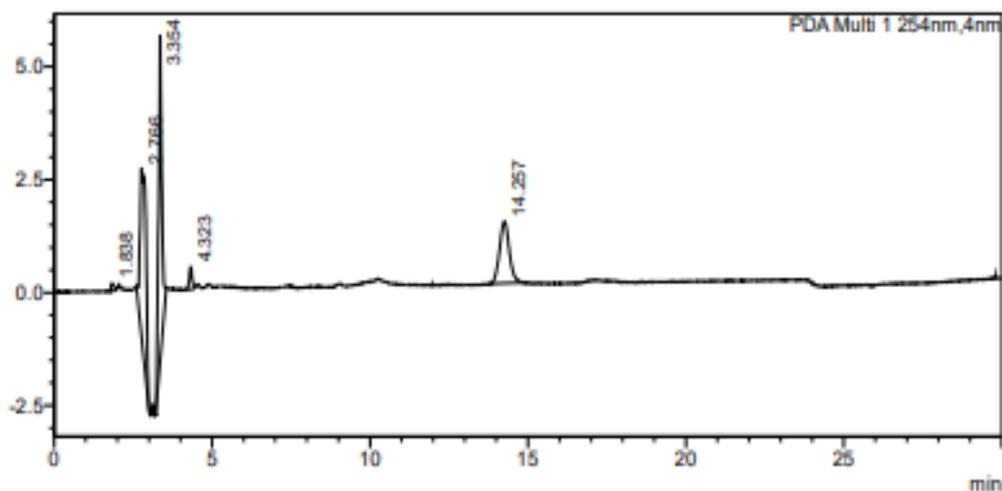


<Sample Information>

Sample Name : std_10 ppm
Sample ID :
Data Filename : std_10 ppm_18112021_002.lcd
Method Filename : ELSA_Catechin.lcm
Batch Filename : Chatechin.lcb
Vial # : 1-2
Injection Volume : 10 uL
Date Acquired : 18/11/2021 14:12:13
Date Processed : 18/11/2021 14:42:15
Sample Type : Unknown
Acquired by : System Administrator
Processed by : System Administrator

<Chromatogram>

mAU



<Peak Table>

PDA Ch1 254nm

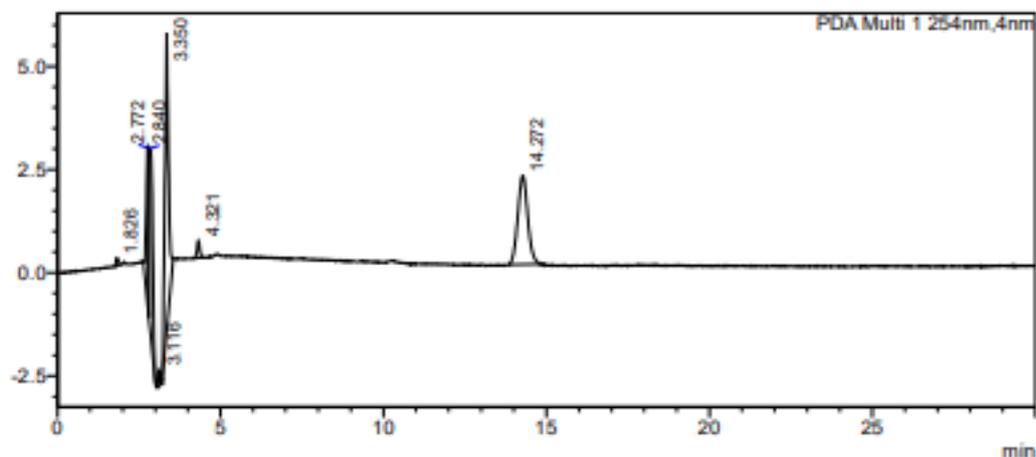
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	1.838	1266	166	0.000			
2	2.766	51993	3727	0.000			
3	3.354	51438	7226	0.000			
4	4.323	3133	487	0.000			
5	14.257	29400	1365	0.000			
Total		137230	12971				

<Sample Information>

Sample Name	: std_25 ppm	Sample Type	: Unknown
Sample ID	:	Acquired by	: System Administrator
Data Filename	: std_25 ppm_18112021_003.lcd	Processed by	: System Administrator
Method Filename	: ELSA_Catechin.lcm		
Batch Filename	: Chatechin.lcb		
Vial #	: 1-3		
Injection Volume	: 10 uL		
Date Acquired	: 18/11/2021 14:42:40		
Date Processed	: 18/11/2021 15:12:43		

<Chromatogram>

mAU



<Peak Table>

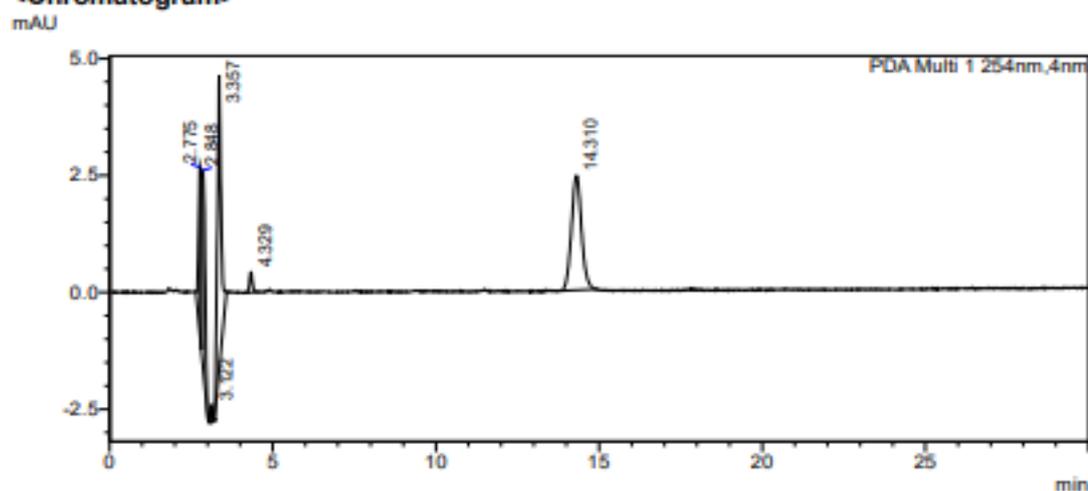
PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	1.826	1088	192	0.000			
2	2.772	21044	3849	0.000			
3	2.840	31839	4372	0.000		V	
4	3.116	1305	361	0.000			
5	3.350	55807	7215	0.000			
6	4.321	2498	412	0.000			
7	14.272	45570	2147	0.000			
Total		159152	18548				

<Sample Information>

Sample Name : std_50 ppm
 Sample ID :
 Data Filename : std_50 ppm_18112021_004.lcd
 Method Filename : ELSA_Catechin.lcm
 Batch Filename : Chatechin.lcb
 Vial # : 1-4
 Injection Volume : 10 uL
 Date Acquired : 18/11/2021 15:13:08
 Date Processed : 18/11/2021 15:43:10
 Sample Type : Unknown
 Acquired by : System Administrator
 Processed by : System Administrator

<Chromatogram>



<Peak Table>

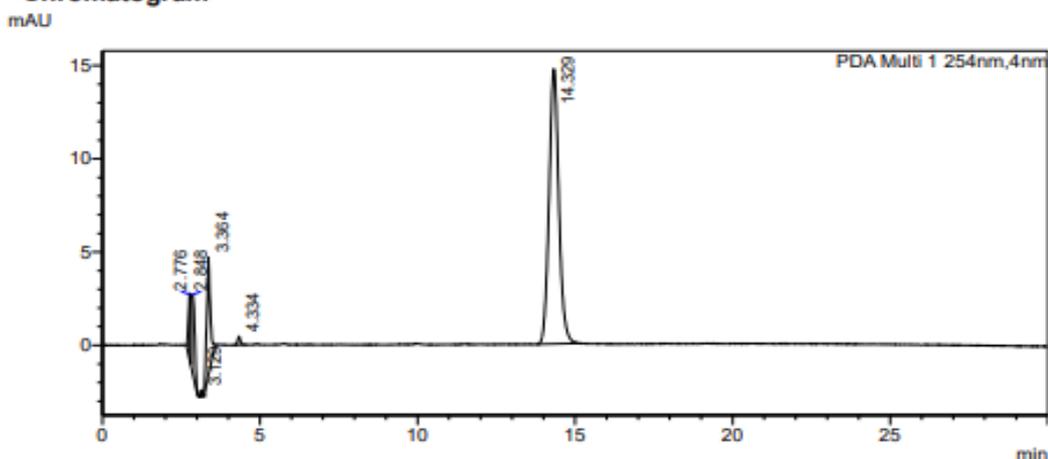
PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	2.775	20827	3604	0.000			
2	2.848	27948	4065	0.000		V	
3	3.122	1259	351	0.000			
4	3.357	49889	6289	0.000			
5	4.329	2537	428	0.000			
6	14.310	52607	2445	0.000			
Total		155067	17182				

<Sample Information>

Sample Name	: std_100 ppm	Sample Type	: Unknown
Sample ID	:	Acquired by	: System Administrator
Data Filename	: std_100 ppm_18112021_005.lcd	Processed by	: System Administrator
Method Filename	: ELSA_Catechin.lcm		
Batch Filename	: Chatechin.lcb		
Vial #	: 1-5		
Injection Volume	: 10 uL		
Date Acquired	: 18/11/2021 15:43:35		
Date Processed	: 18/11/2021 16:13:38		

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	2.776	17534	3548	0.000			
2	2.848	31667	4075	0.000		V	
3	3.129	1233	357	0.000			
4	3.364	49693	6368	0.000			
5	4.334	2659	448	0.000			
6	14.329	317991	14734	0.000			
Tota		420779	29530				

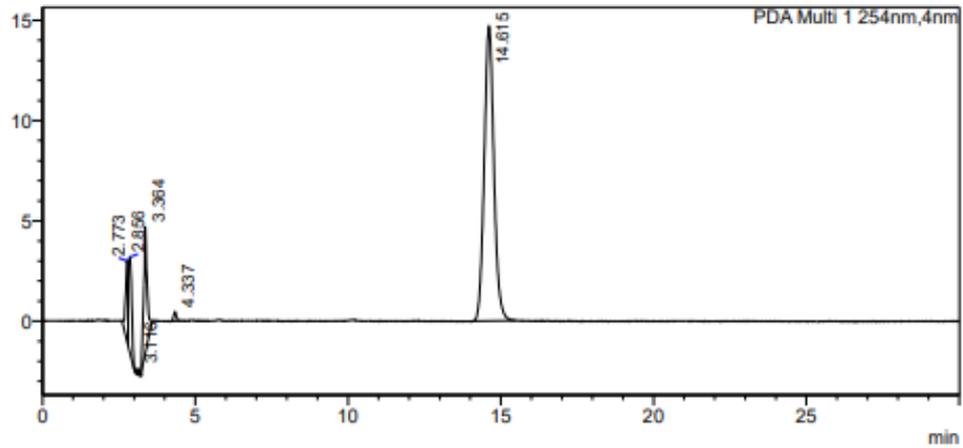


<Sample Information>

Sample Name : std_250 ppm
Sample ID :
Data Filename : std_250 ppm_19112021_002.lcd
Method Filename : ELSA_Catechin.lcm
Batch Filename : Chatechin.lcb
Vial # : 1-10
Injection Volume : 10 uL
Date Acquired : 19/11/2021 11:00:14
Date Processed : 19/11/2021 11:30:16
Sample Type : Unknown
Acquired by : System Administrator
Processed by : System Administrator

<Chromatogram>

mAU



<Peak Table>

PDA.Ch1 254nm

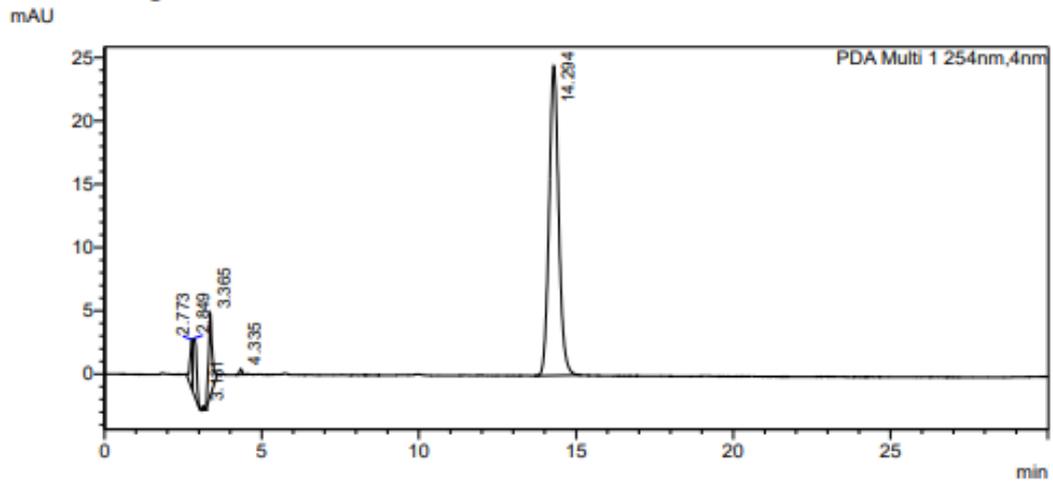
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	2.773	22552	4017	0.000			
2	2.856	33589	4712	0.000		V	
3	3.116	1033	303	0.000			
4	3.364	49486	6344	0.000			
5	4.337	2865	466	0.000			
6	14.615	322351	14664	0.000			
Total		431876	30506				



<Sample Information>

Sample Name : std_500 ppm
Sample ID :
Data Filename : std_500 ppm_18112021_007.lcd
Method Filename : ELSA_Catechin.lcm
Batch Filename : Chatechin.lcb
Vial # : 1-7
Injection Volume : 10 uL
Date Acquired : 18/11/2021 16:44:29
Date Processed : 18/11/2021 17:14:33
Sample Type : Unknown
Acquired by : System Administrator
Processed by : System Administrator

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch1 254nm

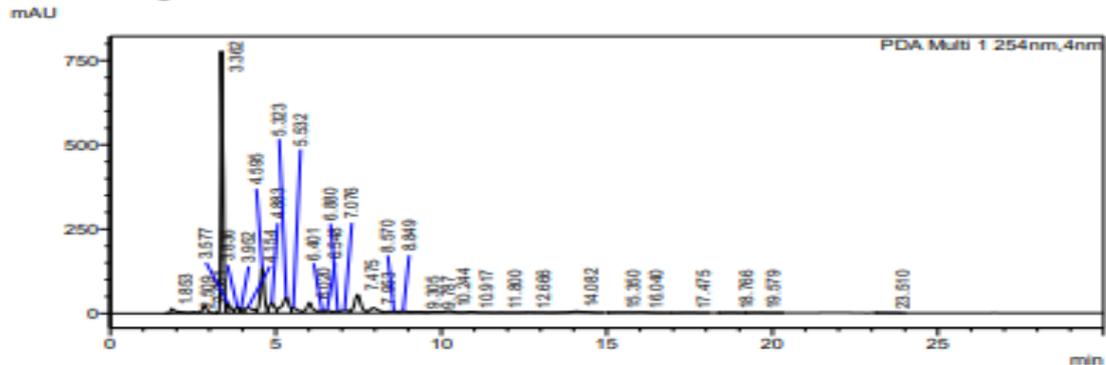
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	2.773	21368	3859	0.000			
2	2.849	34931	4413	0.000		V	
3	3.131	1214	346	0.000			
4	3.365	51434	6516	0.000			
5	4.335	2692	455	0.000			
6	14.294	519463	24432	0.000			
Total		631101	40021				



<Sample Information>

Sample Name : sampel katekin2
 Sample ID :
 Data Filename : sampel katekin2_19112021_003.lcd
 Method Filename : ELSA_Catechin.lcm
 Batch Filename : Chatechin.lcb
 Vial # : 1-11
 Injection Volume : 10 uL
 Date Acquired : 19/11/2021 11:30:42
 Date Processed : 19/11/2021 12:00:43
 Sample Type : Unknown
 Acquired by : System Administrator
 Processed by : System Administrator

<Chromatogram>



<Peak Table>

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	1.853	200891	13255	0.000			
2	2.509	48050	4324	0.000		V	
3	2.861	235598	22349	0.000		V	
4	3.362	3767844	778240	0.000		V	
5	3.577	227961	27736	0.000		V	
6	3.836	155984	19738	0.000		V	
7	3.952	115613	15857	0.000		V	
8	4.154	286191	16829	0.000		V	
9	4.595	1093491	132609	0.000		V	
10	4.883	350000	31459	0.000		V	
11	5.323	688207	46813	0.000		V	
12	5.532	210371	16028	0.000		V	
13	6.020	387789	31012	0.000		V	
14	6.401	79038	7503	0.000		V	
15	6.548	102951	8004	0.000		V	
16	6.880	61872	5946	0.000		V	
17	7.076	145967	8088	0.000		V	
18	7.475	724352	54123	0.000		V	
19	7.953	277410	15547	0.000		V	
20	8.570	109940	4910	0.000		V	
21	8.849	104455	5440	0.000		V	
22	9.305	93527	3876	0.000		V	

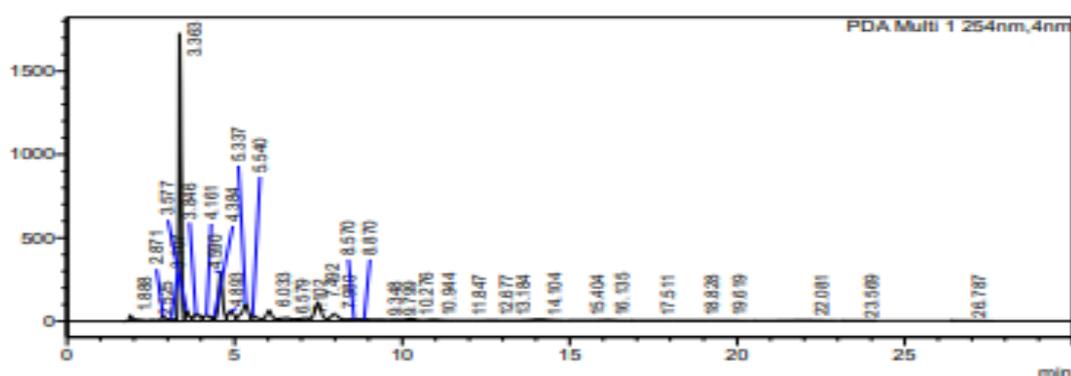
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
23	9.787	73499	3577	0.000		V	
24	10.244	142535	6195	0.000		V	
25	10.917	107297	3532	0.000		V	
26	11.800	22345	902	0.000		V	
27	12.666	62941	1589	0.000		V	
28	14.082	148057	3958	0.000		V	
29	15.350	17964	655	0.000			
30	16.040	50660	1831	0.000		V	
31	17.475	21753	707	0.000			
32	18.766	8415	383	0.000			
33	19.579	18435	535	0.000			
34	23.510	6187	227	0.000			
Total		10145389	1293777				

<Sample Information>

Sample Name : sampel katekin 5000 ppm
 Sample ID :
 Data Filename : sampel katekin 5000 ppm_19112021_001.lcd
 Method Filename : ELSA_Catechin.lcm
 Batch Filename : Chatechin.lcb
 Vial # : 1-12
 Injection Volume : 10 uL
 Date Acquired : 19/11/2021 16:22:51
 Date Processed : 19/11/2021 16:52:54
 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	1.888	400830	33474	0.000			
2	2.525	104183	8836	0.000		V	
3	2.871	309331	29461	0.000		V	
4	3.107	117135	11165	0.000		V	
5	3.363	8258725	1726064	0.000		V	
6	3.577	492447	58330	0.000		V	
7	3.846	592683	43524	0.000		V	
8	4.161	480487	35910	0.000		V	
9	4.384	134284	23927	0.000		V	
10	4.590	2430600	286676	0.000		V	
11	4.893	732693	60264	0.000		V	
12	5.337	1488888	98968	0.000		V	
13	5.540	447208	33222	0.000		V	
14	6.033	839355	63941	0.000		V	
15	6.579	437907	19605	0.000		V	
16	7.102	430779	17470	0.000		V	
17	7.492	1576200	109682	0.000		V	
18	7.980	747199	42576	0.000		V	
19	8.570	254863	11414	0.000		V	
20	8.870	252716	11928	0.000		V	
21	9.348	222050	9336	0.000		V	
22	9.799	191573	8646	0.000		V	

Lampiran 4. Hasil Uji Aktivitas dengan Mesin BACTEC MGIT 960

BACTEC MGIT 960

Unloaded AST Set Report

Instrument Number	Current Date/Time	Temperature			Software Version	Page Number
		A	B	C		
1	17/01/2022 09:35	36.6°C	36.9°C	36.4°C	V6.01B	2

TEH HUAW

Sequence No: 439550131540 TIP: 10;4 SOP: 05/01/2022 11:33 Removed Date: 17/01/2022

Tube Position	Growth Unit	Status	Concentration	Drug Name
C/G11	400	C		Growth Control = Kontrol Positif
C/G12	400	C	ug/mL	Undefined Drug #1 = FRAKSI 2500 ppm (R)
C/G13	400	C	ug/mL	Undefined Drug #2 = FRAKSI 5000 ppm (R)
C/G14	400	C	ug/mL	Undefined Drug #3 = EKSTRAK 2500 ppm (R)
C/G15	400	C	ug/mL	Undefined Drug #4 = EKSTRAK 5000 ppm (R)

TEH HUAW (DUPLU)

Sequence No: 439550132830 TIP: 9;6 SOP: 05/01/2022 11:33 Removed Date: 17/01/2022

Tube Position	Growth Unit	Status	Concentration	Drug Name
C/G16	400	C		Growth Control = Kontrol Positif (R)
C/G17	400	C	ug/mL	Undefined Drug #1 = FRAKSI 2500 ppm (R)
C/G18	400	C	ug/mL	Undefined Drug #2 = FRAKSI 5000 ppm (R)
C/G19	400	C	ug/mL	Undefined Drug #3 = EKSTRAK 2500 ppm (R)
C/G20	400	C	ug/mL	Undefined Drug #4 = EKSTRAK 5000 ppm (R)

Lampiran 4. Perhitungan

1. Perhitungan % Rendemen

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Massa Ekstrak yang Diperoleh}}{\text{Massa Awal}} \times 100 \%$$

- Ekstrak Etanol 30 menit

$$\text{Rendemen} = \frac{6,405}{50} \times 100 \% = 12,81 \%$$

- Ekstrak Etanol 60 menit

$$\text{Rendemen} = \frac{7,339}{50} \times 100 \% = 14,678 \%$$

- Ekstrak Etil Asetat 30 menit

$$\text{Rendemen} = \frac{2,284}{50} \times 100 \% = 4,568 \%$$

- Ekstrak Etil Asetat 60 menit

$$\text{Rendemen} = \frac{2,784}{50} \times 100 \% = 5,568 \%$$

- Ekstrak Air 30 menit

$$\text{Rendemen} = \frac{23,071}{50} \times 100 \% = 46,142 \%$$

- Ekstrak Air 60 menit

$$\text{Rendemen} = \frac{11,684}{50} \times 100 \% = 23,368 \%$$

2. Analisis Data Metode Kalibrasi standar dengan UV-Vis

a. Pembuatan Larutan Sampel Uji 1000 ppm dalam 10 mL

$$\text{Ppm} = \frac{\text{mg}}{\text{L}}$$

$$1000 = \frac{\text{mg}}{0,01}$$

$$\text{mg} = 10$$

b. Pembuatan Larutan Induk 1000 ppm dalam 10 mL

$$\text{Ppm} = \frac{\text{mg}}{\text{L}}$$

$$1000 = \frac{\text{mg}}{0,01}$$

$$\text{mg} = 10$$

c. Pengenceran Larutan Standar

$$\text{Rumus} = \boxed{V1 \times M1 = V2 \times M2}$$

- Konsentrasi 250 ppm

- Konsentrasi 50 ppm

$V_1 \cdot 1000 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \cdot 250 \text{ ppm}$	$\cdot 1000 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \cdot 50 \text{ ppm}$
$V_1 = 2,5 \text{ mL}$	$V_1 = 0,5 \text{ mL}$
• Konsentrasi 125 ppm	• Konsentrasi 25 ppm
$V_1 \cdot 1000 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \cdot 125 \text{ ppm}$	$\cdot 1000 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \cdot 25 \text{ ppm}$
$V_1 = 1,25 \text{ mL}$	$V_1 = 0,25 \text{ mL}$
• Konsentrasi 100 ppm	• Konsentrasi 10 ppm
$V_1 \cdot 1000 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \cdot 100 \text{ ppm}$	$\cdot 1000 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \cdot 10 \text{ ppm}$
$V_1 = 1 \text{ mL}$	$V_1 = 0,1 \text{ mL}$
• Konsentrasi 75 ppm	• Konsentrasi 5 ppm
$V_1 \cdot 1000 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \cdot 75 \text{ ppm}$	$\cdot 1000 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \cdot 5 \text{ ppm}$
$V_1 = 1,75 \text{ mL}$	$V_1 = 0,05 \text{ mL}$

d. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Standar Katekin

• Data Nilai Absorbansi

Panjang Gelombang (nm)	Absorbansi
250	0,174
260	0,219
270	0,131
280	0,532
290	0,453
300	0,172
310	0,122
320	0,094
330	0,074
340	0,058
350	0,052
360	0,052
370	0,063
380	0,072
390	0,075
400	0,075

- Grafik Hubungan Panjang Gelombang vs Absorbansi

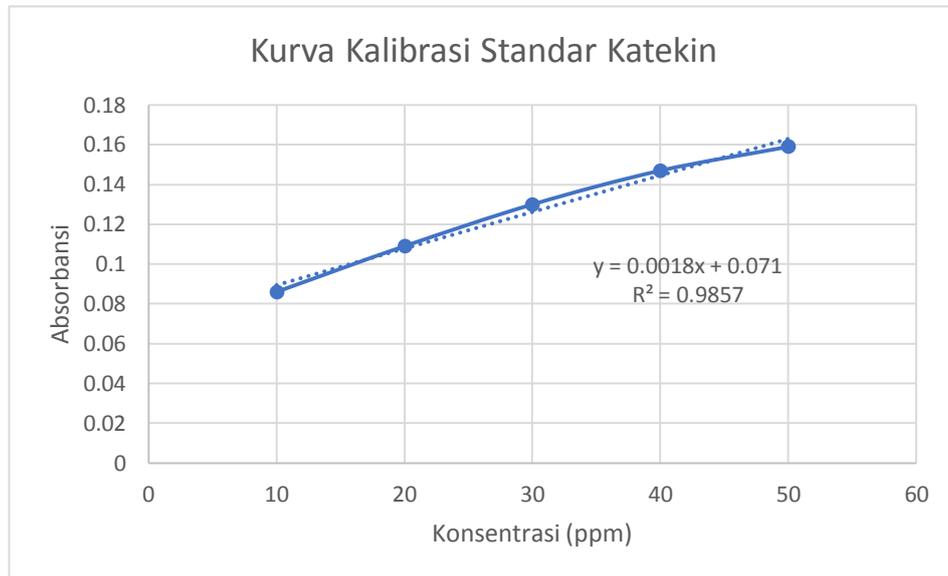


- Penentuan Kadar Sampel

Data Kalibrasi Standar Katekin

Sampel	Lama Ekstraksi	Absorbansi	Kadar
Ekstrak EtOH	60	0,241	94,44
	30	0,219	82,22
Ekstrak EA	60	0,135	35,56
	30	0,094	12,78
Ekstrak Air	60	0,096	13,89
	30	0,093	12,22

Kurva Kalibrasi Standar



Perhitungan Kadar Sampel melalui Persamaan Regresi Linear

Persamaan Regresi Linear

$$y = 0,0018x + 0,071$$

<p>- Ekstrak EtOH 60 menit</p> $y = 0,0018x + 0,071$ $0,241 = 0,0018x + 0,071$ $0,241 - 0,071 = 0,0018x$ $x = 94,44 \text{ ppm}$	<p>- Ekstrak EtOH 30 menit</p> $y = 0,0018x + 0,071$ $0,219 = 0,0018x + 0,071$ $0,219 - 0,071 = 0,0018x$ $x = 82,22 \text{ ppm}$
<p>- Ekstrak EA 60 menit</p> $y = 0,0018x + 0,071$ $0,135 = 0,0018x + 0,071$ $0,135 - 0,071 = 0,0018x$ $x = 35,56 \text{ ppm}$	<p>- Ekstrak EA 30 menit</p> $y = 0,0018x + 0,071$ $0,094 = 0,0018x + 0,071$ $0,094 - 0,071 = 0,0018x$ $x = 12,78 \text{ ppm}$
<p>- Ekstrak Air 60 menit</p> $y = 0,0018x + 0,071$ $0,096 = 0,0018x + 0,071$	<p>- Ekstrak Air 30 menit</p> $y = 0,0018x + 0,071$ $0,093 = 0,0018x + 0,071$

$0,096 - 0,071 = 0,0018x$ $x = 13,89 \text{ ppm}$	$0,093 - 0,071 = 0,0018x$ $x = 12,22 \text{ ppm}$
---	---

3. Perhitungan Nilai Rf pada KLT

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh oleh komponen}}{\text{Jarak yang ditempuh oleh eluen}}$$

a. Nilai Rf Hasil Kolom 1	b. Nilai Rf Hasil Kolom 2
<ul style="list-style-type: none"> Rf Standar $RF = \frac{3,1 \text{ cm}}{4,5 \text{ cm}} = 0,68$ 	<ul style="list-style-type: none"> Rf Standar $RF = \frac{2,2 \text{ cm}}{5 \text{ cm}} = 0,44$
<ul style="list-style-type: none"> Rf Fraksi 2 $RF = \frac{3,4 \text{ cm}}{5 \text{ cm}} = 0,68$ 	<ul style="list-style-type: none"> Rf Fraksi 27 $RF = \frac{2,2 \text{ cm}}{5 \text{ cm}} = 0,44$
<ul style="list-style-type: none"> Rf Fraksi 3 $RF = \frac{3,3 \text{ cm}}{5 \text{ cm}} = 0,66$ 	<ul style="list-style-type: none"> Rf Fraksi 30 $RF = \frac{2,1 \text{ cm}}{5 \text{ cm}} = 0,42$
<ul style="list-style-type: none"> Rf Fraksi 5 $RF = \frac{3,2 \text{ cm}}{5 \text{ cm}} = 0,64$ 	<ul style="list-style-type: none"> Rf Fraksi 33 $RF = \frac{2,1 \text{ cm}}{5 \text{ cm}} = 0,42$
<ul style="list-style-type: none"> Rf Fraksi 7 $RF = \frac{3,2 \text{ cm}}{5 \text{ cm}} = 0,64$ 	<ul style="list-style-type: none"> Rf Standar $RF = \frac{4,9 \text{ cm}}{5,2 \text{ cm}} = 0,94$
<ul style="list-style-type: none"> Rf Fraksi 9 $RF = \frac{3,4 \text{ cm}}{5 \text{ cm}} = 0,68$ 	<ul style="list-style-type: none"> Rf Fraksi 35 $RF = \frac{4,9 \text{ cm}}{5,2 \text{ cm}} = 0,94$

4. Perhitungan Kadar Katekin dengan HPLC

Persamaan Regresi Linear

$$y = 1010,5x + 16700$$

<p>- Isolat 2500 ppm</p> $y = 1010,5x + 16700$ $148057 = 1010,5x + 16700$ $x = 129,99 \text{ ppm}$ $\% = \frac{129,99 \text{ ppm}}{2500 \text{ ppm}} \times 100$ $= 5,2\%$	<p>- Isolat 5000 ppm</p> $y = 1010,5x + 16700$ $472607 = 1010,5x + 16700$ $x = 451,17 \text{ ppm}$ $\% = \frac{451,17 \text{ ppm}}{5000 \text{ ppm}} \times 100$ $= 9,02\%$
---	--

5. Perhitungan Pembuatan Larutan Uji Obat Antituberkulosis

Pembuatan Larutan Sampel Uji 10 mg dalam 2,5 mL

a. Streptomisin

$$\text{Ppm} = \frac{mg}{L}$$

$$\text{ppm} = \frac{10000 \text{ g}}{2,5 \text{ mL}}$$

$$\text{ppm} = 4000 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

Diencerkan menjadi 1 $\mu\text{g/mL}$

$$V_1 \cdot 4000 \text{ } \mu\text{g/mL} = 10 \text{ mL} \cdot 1 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$V_1 = 0,0025 \text{ mL}$$

b. Levofloksasin

$$\text{Ppm} = \frac{mg}{L}$$

$$\text{ppm} = \frac{10000 \text{ g}}{2,5 \text{ mL}}$$

$$\text{ppm} = 4000 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

Diencerkan menjadi 1 $\mu\text{g/mL}$

$$V_1 \cdot 4000 \text{ } \mu\text{g/mL} = 10 \text{ mL} \cdot 1 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$V_1 = 0,0025 \text{ mL}$$

c. Moksifloksasin

$$\text{Ppm} = \frac{mg}{L}$$

$$\text{ppm} = \frac{10000 \text{ g}}{2,5 \text{ mL}}$$

$$\text{ppm} = 4000 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

Diencerkan menjadi 1 $\mu\text{g/mL}$

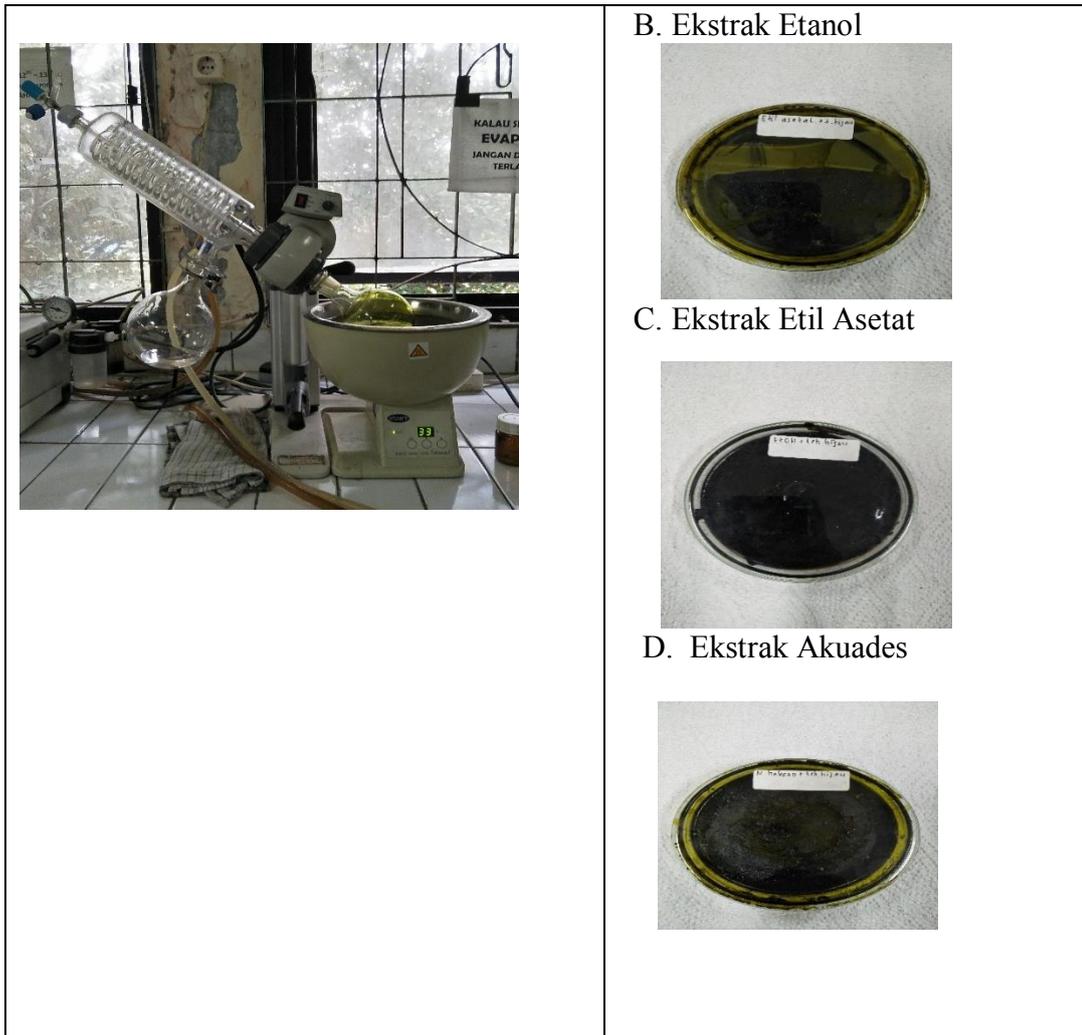
$$V_1 \cdot 4000 \text{ } \mu\text{g/mL} = 10 \text{ mL} \cdot 1 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$V_1 = 0,0025 \text{ mL}$$

Lampiran 6. Dokumentasi Penelitian

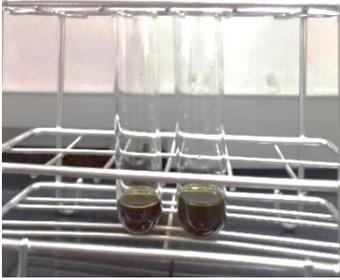
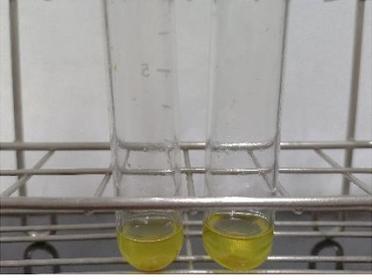
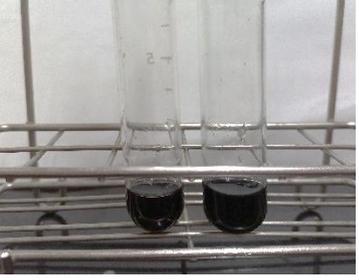
6.1.1 Ekstraksi Daun Teh Hijau

Perendaman Serbuk daun Teh Hijau	Penyaringan
	
Evaporasi	Hasil Ekstrak Kering



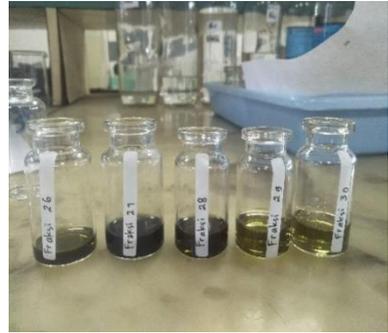
6.1.2 Hasil Uji Kualitatif Katekin dengan Reagen FeCl_3

	Sebelum reaksi	Setelah reaksi
Ekstrak Etanol		

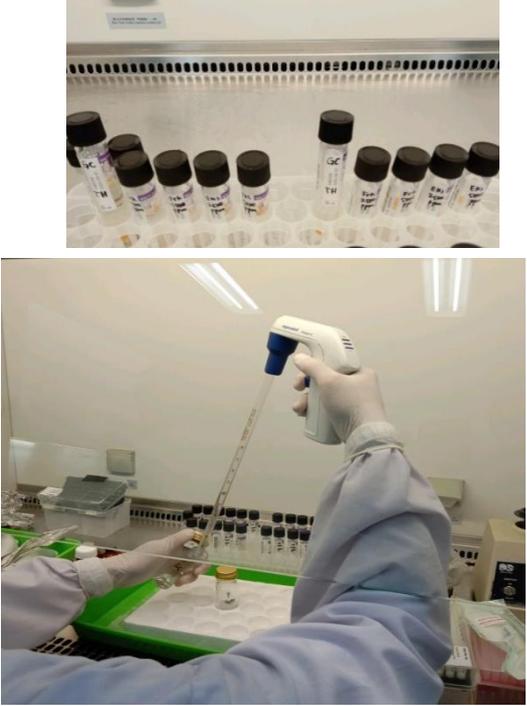
Ekstrak Etil Asetat		
Ekstrak Air		

6.1.3 Proses Isolasi Senyawa Katekin

Pemisahan Kolom 1	Fraksi Pemisahan Kolom 1
	
Pemisahan Kolom 2	Fraksi Pemisahan Kolom 2

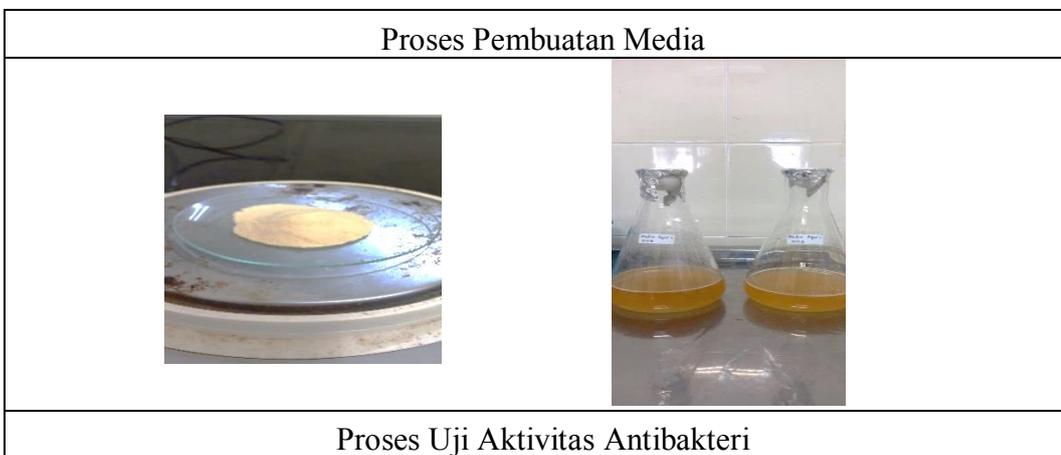


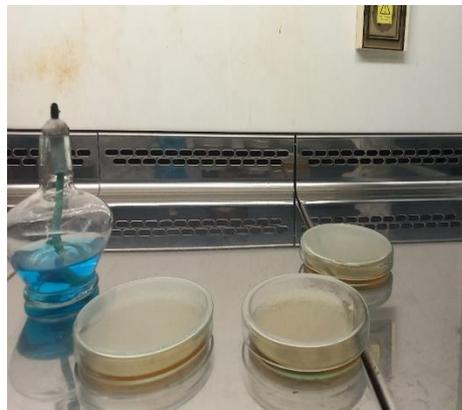
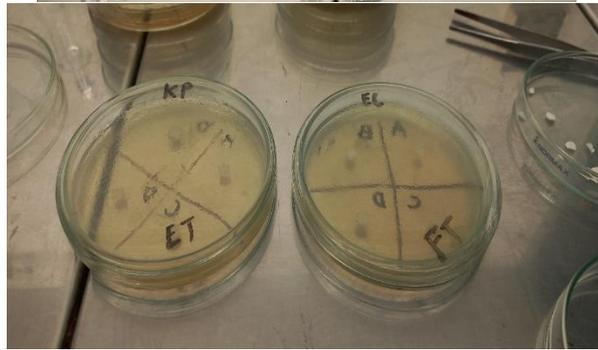
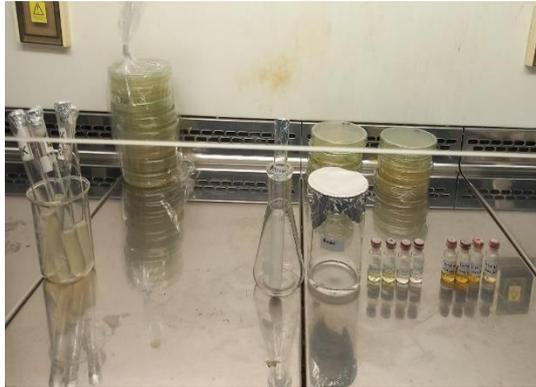
6.1.4 Proses Uji Kepekaan MTB H37Rv terhadap Sampel Senyawa Katekin dengan Metode BACTEC MGIT 960

Uji Sterilitas Bakteri dan Sampel Uji pada media Agar Darah	Persiapan inokulasi Bakteri
	
Persiapan Rangkaian AST	
	



6.1.5 Uji Aktivitas Antibakteri dengan Metode Cakram

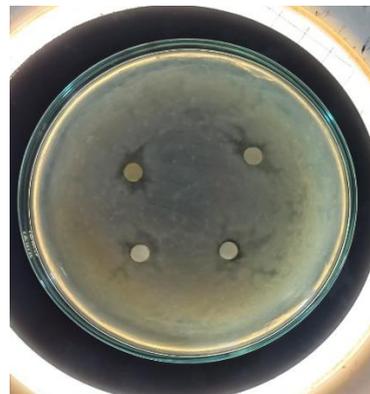
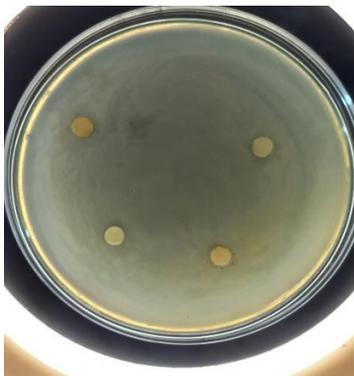




Hasil Uji Aktivitas Antibakteri

K. pneumonia

S. aureus



<i>S. pyogenes</i>	<i>E. coli</i>
	

