

**UJI AKTIVITAS ANTIJAMUR, PENENTUAN KONSENTRASI HAMBAT
MINIMU (KHM) DAN KONSENTRASI BUNUH MINIMUM (KBM)
SERTA KLT-BIOAUTOGRAFI EKSTRAK ETANOL DAUN
PLETHEKAN (*Ruellia tuberosa* L.) TERHADAP *Candida albicans***

SKRIPSI

**Oleh:
NUR MUTAMMIMA
NIM. 12630061**



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
2017**

**UJI AKTIVITAS ANTIJAMUR, PENENTUAN KONSENTRASI HAMBAT
MINIMU (KHM) DAN KONSENTRASI BUNUH MINIMUM (KBM)
SERTA KLT-BIOAUTOGRAFI EKSTRAK ETANOL DAUN
PLETHEKAN (*Ruellia tuberosa* L.) TERHADAP *Candida albicans***

SKRIPSI

**Oleh:
NUR MUTAMMIMA
NIM. 12630061**

**Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji
Tanggal: 03 Januari 2017**

Pembimbing I



**Akyunul Jannah, S.Si, M.P
NIP. 19750410 200501 2 009**

Pembimbing II



**Ahmad Hanapi, M.Sc
NIDT. 19851225 201608011 069**



**Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia**

**Elok Kamilah Hayati, M.Si
NIP. 19790620 200604 2 002**

UJI AKTIVITAS ANTIJAMUR, PENENTUAN KONSENTRASI HAMBAT
MINIMU (KHM) DAN KONSENTRASI BUNUH MINIMUM (KBM)
SERTA KLT-BIOAUTOGRAFI EKSTRAK ETANOL DAUN
PLETHEKAN (*Ruellia tuberosa* L.) TERHADAP *Candida albicans*

SKRIPSI

Oleh:
NUR MUTAMMIMA
NIM. 12630061

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: 03 Januari 2017

Penguji Utama : A. Ghanaim Fasya, M.Si (.....)
NIP. 19820616 200604 1 002

Ketua Penguji : Anik Maunatin, S.T, M.P (.....)
NIPT. 20140201 2 412

Sekretaris Penguji : Akyunul Jannah, S.Si, M.P (.....)
NIP. 19750410 200501 2 009

Anggota Penguji : Ahmad Hanapi, M.Sc (.....)
NIDT. 19851225 201608011 069



Mengesahkan,
Ketua Jurusan Kimia
Elok Kamillah Hayati, M.Si
NIP. 19790620 200604 2 002

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Nur Mutammima

NIM : 12630061

Jurusan : Kimia

Fakultas : Sains dan Teknologi

Judul Penelitian : Uji Aktivitas Antijamur, Penentuan Konsentrasi Hambat minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) serta KLT-Bioautografi Ekstrak Etanol Daun Plethehan (*Ruellia tuberosa* L.) terhadap *Candida albicans*

menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 03 Januari 2017

Yang membuat pernyataan,



Nur Mutammima
NIM. 12630061

KATA PENGANTAR

Alhamdulillahirobbil ‘Alamin, segala puji bagi Allah yang maha pengasih lagi maha penyayang dan telah memberikan segala rahmat dan kenikmatan sehingga penulis mampu menyelesaikan skripsi dengan judul “Uji Aktivitas Antijamur, Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) serta KLT-Bioautografi ekstrak Etanol Daun Plethekan (*Ruellia tuberosa* L.) terhadap *Candida albicans*” dengan lancar dan semaksimal mungkin.

Shalawat serta salam selalu kami haturkan pada junjungan kita, Nabi Muhammad SAW yang membimbing kita menuju jalan yang benar yakni jalan yang diridhoi oleh Allah SWT. laporan hasil penelitian ini disusun sebagai tahapan untuk menuju skripsi sebagai salah satu upaya mencapai gelar Strata 1 sebagai pengaplikasian ilmu yang didapat.

Ucapan terimakasih juga penulis sampaikan kepada:

1. Bapak dan Ibu tercinta sebagai orang tua serta saudara-saudara penulis yang selalu memberi motivasi, doa dan dukungan kepada penulis.
2. Bapak Prof. Dr. H. Mudjia Raharjo, M.Si, selaku Rektor Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Dr. Hj. Bayyinatul M, drh, M.Si selaku dekan Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang
4. Ibu Elok Kamilah Hayati, M,Si selaku ketua jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang
5. Ibu Akyunul Jannah M.P selaku dosen pembimbing yang telah memberikan bimbingan, motivasi serta arahan kepada penulis hingga akhir.

6. Ibu Anik Maunatin M.P selaku dosen konsultan yang telah memeberikan bimbingan, pengarahan, dan nasehat kepada penulis.
7. Seluruh dosen jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah mengalirkan ilmu, pengetahuan, pengalaman, wacana dan wawasannya, sebagai pedoman dan bekal bagi penulis.
8. Teman-teman Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang angkatan 2012 yang telah memberi motivasi dan informasi kepada penyusun dalam menyelesaikan proposal penelitian ini
9. Semua rekan-rekan dan semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu atas segala bantuan dan motivasinya kepada penyusun.

Akhirnya atas segala kekurangan dari skripsi ini, sangat diharapkan saran dan kritik yang bersifat konstruktif dari semua pembaca demi sempurnanya skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat memberikan kontribusi positif serta bermanfaat bagi kita semua, Amin.

Malang, Januari 2017

Penyusun

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
ABSTRAK	xiii
ABSTRACT	xiv
ملخص البحث	xv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	7
1.3 Tujuan Penelitian	7
1.4 Batasan Masalah	8
1.5 Manfaat Penelitian	8
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	9
2.1 Tanaman Plethekan (<i>Ruellia tuberosa</i> L.)	9
2.1.1 Kandungan Kimia Tanaman Plethekan	10
2.1.2 Khasiat Tanaman Plethekan	10
2.2 Jamur <i>Candida albicans</i>	12
2.2.2 Biakan <i>Candida albicans</i>	13
2.2.3 Virulensi <i>Candida albicans</i>	15
2.2.4 Patogenitas	16
2.2.5 Gambaran Klinik	17
2.3 Senyawa Antijamur	17
2.4 Metode Pengujian Aktivitas Antijamur	19
2.5 Ekstraksi Maserasi	22
2.6 Uji Fitokimia	24
2.6.1 Flavonoid	25
2.6.2 Terpenoid	26
2.6.3 Steroid	27
2.6.4 Alkaloid	27
2.6.5 Saponin	28
2.6.6 Tanin	29
2.7 KLT-Bioautografi	29
2.7.1 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	29
2.7.2 Bioautografi	31

BAB III METODOLOGI PENELITIAN	34
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	34
3.2 Alat dan Bahan	34
3.2.1 Alat	34
3.2.2 Bahan	34
3.3 Rancangan Penelitian	35
3.4 Tahapan Penelitian	36
3.5 Prosedur Penelitian.....	37
3.5.1 Preparasi Sampel.....	37
3.5.2 Pengukuran Kadar Air.....	37
3.5.3 Ekstraksi Maserasi	38
3.5.4 Identifikasi Golongan Senyawa Aktif ekstrak Etanol Daun Plethekan dengan Uji Fitokimia	38
3.5.4.1 Uji Alkaloid	38
3.5.4.2 Uji Tanin	39
3.5.4.3 Uji Steroid dan Triterpenoid	39
3.5.4.4 Uji Flavonoid	39
3.5.4.5 Uji Saponin	39
3.5.5 Uji Aktivitas Antijamur	40
3.5.5.1 Sterilisasi.....	40
3.5.5.2 Pembuatan Media Saboraud Dextrose Agar (SDA) dan Media Saboraud Dextrose Broth (SDB).....	40
3.5.5.3 Peremajaan Biakan Jamur <i>Candida albicans</i>	40
3.5.5.4 Pembuatan Suspensi Jamur <i>Candida albicans</i>	41
3.5.5.5 Uji Daya Hambat Ekstrak Etanol Daun plethekan terhadap Jamur <i>Candida albicans</i>	41
3.5.5.6 Uji kadar hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimum (KBM) Ekstrak Etanol Daun plethekan terhadap Jamur <i>Candida albicans</i>	42
3.5.6 Pemisahan Senyawa dengan Kromatografi Lapis Tipis Analitik	43
3.5.7 Uji Aktivitas Antijamur dengan Metode Bioautografi	44
3.5.8 Analisis Data	44
 BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	 45
4.1 Preparasi Sampel.....	45
4.2 Pengukuran Kadar Air.....	45
4.3 Ekstraksi Maserasi	46
4.4 Identifikasi Golongan Senyawa Aktif ekstrak Etanol Daun Plethekan dengan Uji Fitokimia	47
4.4.1 Uji Saponin	48
4.4.2 Uji Alkaloid	48
4.4.3 Uji Tanin	49
4.4.4 Uji Steroid dan Triterpenoid	49
4.4.5 Uji Flavonoid	50
4.5 Uji Daya Hambat Ekstrak Etanol Daun plethekan terhadap Jamur <i>Candida albicans</i>	51

4.6 Uji konsentrasi hambat Minimum (KHM) dan konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) Ekstrak Etanol Daun plethekan terhadap Jamur <i>Candida albicans</i>	54
4.7 Pemisahan Senyawa dengan Kromatografi Lapis Tipis Analitik	57
4.7.1 Uji Tanin	57
4.7.2 Uji Flavonoid	60
4.7.3 Uji Triterpenoid	62
4.8 Uji Aktivitas Antijamur dengan Metode Bioautografi.....	65
4.9 Analisis Data	68
BAB V PENUTUP	70
5.1 Kesimpulan	70
5.2 Saran.....	70
DAFTAR PUSTAKA	71
LAMPIRAN	80

DAFTAR TABEL

4.1	Hasil uji fitokimia ekstrak etanol daun plethekan	47
4.2	Hasil uji KHM (absorbansi) dan KBM (pertumbuhan jamur)	56
4.3	Variasi eluen pada pemisahan senyawa tanin dan hasil pemisahannya ...	58
4.4	Hasil KLTA senyawa tanin ekstrak etanol daun plethekan dengan eluen kloroform:asam asetat:air (3:1,5:0,5)	59
4.5	Variasi eluen pada pemisahan senyawa flavonoid dan hasil pemisahannya	60
4.6	Hasil KLTA senyawa flavonoid ekstrak etanol daun plethekan dengan eluen butanol:asam asetat:air (4:1:5)	61
4.7	Variasi eluen pada pemisahan senyawa triterpenoid dan hasil pemisahannya	62
4.8	Hasil KLTA senyawa triterpenoid ekstrak etanol daun plethekan dengan eluen etil asetat:n-heksana (1:1)	63

DAFTAR GAMBAR

2.1	Tanaman plethekan (<i>Ruellia tuberosa</i> L.)	10
2.2	Struktur Dinding sel <i>Candida albicans</i>	13
2.4	Kultur <i>Candida albicans</i> pada media SDA	14
2.5	Kurva pertumbuhan jamur <i>Candida albicans</i>	14
2.6	Struktur inti senyawa flavonoid.....	26
2.7	Struktur inti senyawa terpenoid	27
2.8	Struktur inti senyawa steroid	27
2.9	Struktur inti senyawa alkaloid	28
2.10	Struktur inti senyawa saponin.....	28
2.11	Struktur inti senyawa tanin	29
2.12	Proses Bioautografi.....	33
4.1	Reaksi dugaan pembentukan kompleks Fe tanin yang berwarna hijau-kehitaman	49
4.2	Perkiraan reaksi antara senyawa flavonoid Mg-HCl	51
4.3	Hasil zona hambat ekstrak etanol daun plethekan terhadap <i>Candida albicans</i>	52
4.4	Hasil KLTA senyawa tanin dengan eluen kloroform:asam asetat:air (3:1,5:0,5)	59
4.5	Hasil KLTA senyawa flavonoid dengan eluen butanol:asam asetat:air (4:1:5)	61
4.6	Hasil KLTA senyawa triterpenoid dengan eluen etil asetat:n-heksana (1:1)	63
4.7	Hasil bioautografi golongan triterpenoid dan perbandingannya dengan hasil KLTA	66

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Rancangan penelitian.....	80
Lampiran 2	Diagram alir	81
Lampiran 3	Pembuatan dan perhitungan reagen	88
Lampiran 4	Tabel data analisis	92
Lampiran 5	Data hasil Uv-vis tahap KHM	94
Lampiran 6	Dokumentasi	98

ABSTRAK

Mutammima, N. 2016. Uji Aktivitas Antijamur, Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum serta KLT-Bioautografi Ekstrak Etanol Daun Plethekan (*Ruellia tuberosa* L.) terhadap *Candida albicans*. Pembimbing I: Akyunul Jannah, M.P; Pembimbing II: Ahmad Hanapi, M.Sc; Konsultan: Anik Maunatin, M.P.

Kata Kunci : Daun plethekan (*Ruellia tuberosa* L.), *Candida albicans*, KHM dan KBM, Bioautografi kontak

Plethekan mengandung beberapa senyawa aktif diantaranya triterpenoid, flavonoid, tanin dan alkaloid. Beberapa diantaranya dianggap memiliki aktivitas penghambatan terhadap jamur khususnya *Candida albicans* yang merupakan penyebab utama infeksi kandidiasis vaginalis. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keefektifan senyawa yang terkandung didalam daun plethekan terhadap pertumbuhan jamur *Candida albicans* dalam uji aktifitas, KHM dan KBM, KLT-bioautografi.

Daun plethekan diekstraksi maserasi selama 5 hari lalu dipekatkan dengan *rotary evaporator vacum*. Ekstrak yang dihasilkan dilanjutkan dengan uji identifikasi senyawa dengan fitokimia untuk senyawa triterpenoid, flavonoid, alkaloid, tanin dan saponin. Ekstrak pekat (0,1 g/mL) selanjutnya dilakukan uji aktivitas antijamur terhadap jamur *Candida albicans* dengan metode difusi cakram. Pengujian KHM dilakukan dengan metode dilusi cair untuk konsentrasi 10-25 mg/mL. Sedangkan pada penentuan KBM dilakukan dengan metode perhitungan jumlah koloni. Uji KLT-bioautografi dilakukan dengan menggunakan metode bioautografi kontak.

Hasil fitokimia menunjukkan senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak etanol daun plethekan adalah flavonoid, tanin dan triterpenoid. Uji aktivitas menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun plethekan mampu menghambat pertumbuhan jamur *Candida albicans* dengan zona hambat sebesar 22,4 mm. Sedangkan pada hasil pengujian KHM dan KBM ekstrak etanol daun plethekan belum mampu menghambat pertumbuhan jamur *Candida albicans* secara optimum. Pada pengujian KLT bioautografi, senyawa aktif yang menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap jamur *Candida albicans* adalah triterpenoid.

ABSTRAC

Mutammima, N. 2016. Antifungal Activity Test, Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC) also TLC- Bioautography Ethanol Extract of Plethekan Leaf (*Ruellia tuberosa* L.) through *Candida albicans*. Advisor I: Akyunul Jannah, M.P; Advisor II: Ahmad Hanapi, M.Sc; Consultan: Anik Maunatin, M.P.

Key Word: *Plethekan* leaf (*Ruellia tuberosa* L.), *Candida albicans*, MIC and MFC, Bioautografi contact.

Plethekan leaf consists of several active compounds; those are triterpenes, falvonoids, tannins and alkaloid. Those compounds are considered to be able to inhibit fungi, especially *candida albicans* which is the main cause of *candidis vaginalis* infection. This research is conducted to examine the effectiveness of compounds mentioned within *plethekan* leaf by antifungal activity test, MIC and MFC, TLC-bioautography.

This leaf was extracted using maceration method for five days to be concentrated with rotary evaporator vacuum. The extraction result was examined using compound identification of phytochemical for triterpenes, flavonoids, alkaloids, tannins and saponins. Ethanol extract of leaf *plethekan* (0.1 g/mL) was tested using antifungal activity test with disc diffusion method through *candida albicans*. MIC test was conducted using delusive liquid for concentration 10-25 mg/mL. MFC determination was tested utilizing total colony calculation. TLC-bioautography test was examined using bioautography contact method.

The result of phytochemical identification indicated that the active compounds in ethanol extract of *plethekan* leaf were flavonoids, tannins, and triterpenes. The Antifungal activity test indicated that the extract of the leaf having an ability to inhibit *candida albicans* with 22,4 mm inhibition zone. However, the result of MIC and MIF test revealed that the ability of ethanol extract in inhibiting the fungus was poor. On the other hand, TLC-bioautography test showed that triterpenoid was the active compound which could inhibit *Candida albicans*.

ملخص البحث

متمم، نور. 2016. اختبار نشاط مضاد الفطر ، تعيين تركيز الحدود الأقلية (KHM) و تركيز قتل الأقلية (KBM) و بيوتوغرافي مقتطف الإيتانول من أوراق الفالاتيكان (ريوليا تويراسا لا) يواجه إلى جانديد الألبكانس. تقرير البحث. قسم الكيمياء، كلية العلوم و التكنولوجيا، جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج. المشرفة الأولى : أعين الجنة الماجستير، المساعدة : أنيك موناتين الماجستير.

الكلمة المفتاحية : الأوراق فالاتيكان (ريوليا تويراسا) جانديد ألبكانس، بيأوتوغرافي الإتصالي

فالاتكان هو النبات التي تجد بسهولة لانه انتشر في جميع مناطق إندونيسيا. و الأوراق من الفالاتكان يحتوي على المراكب الفعالية التي لها تساوي بصفة مضاد الفطر إلى جانديد ألبكانس منها تريرفينويد، تريرفينويد، تانين وألكالويد. جانديد ألبكانس هو الأسباب الأولى من إصابة مهبلية المبيضات وهي ما إصابة الغينيتاليا في النساء المعلق بتخرج السوائل البيضاء المثل اللبن أو يعرف بالبياض. هذه الإصابة تصبح شكوى كثيرة عند النساء لأن شعرت بها الحكمة و الحريف. فإذا يحتاج إلى اختبار النشاط في ضمن أوراق الفالاتيكان إلى الفطر جانديد ألبكانس إما من النشاط مضاد الفطر، والمراقبة (KHM)، و عملية التدريس (KBM) وبيوتوغرافي.

اختبار النشاط مضاد الفطر من مقتطف الإيتانول من أوراق الفالاتيكان تستخدم إلى تركيز المقتطف 10 % من طريقة انتشار الأوراق القرصة. اختبار تركيز الحدود الأقلية (KHM) أقام بطريقة تخفيف السائل على تركيز 10-25 ملغ/ملح. مع أن في تعيين تركيز قتل القليل (KBM) أقام بطريقة، تتزاع المقتطف الإيجابية في اختبار (KHM) في وسائل الصلب. اختبار فيتوكيمياء اقام بمركب تريرفينويد، فالافونويد، ألكالويد، تانين، فينول و سافونين. KLT بيوتوغرافي أقام باستخدام طريقة بيوتوغرافي الإتصالي.

ظاهر اختبار النشاط أن مقتطف الإيتانول من أوراق الفالاتيكان قدر إلى حد تنمية الفطر جانديدي ألبكان في مجال الحد و يستغرق إلى 26 ملم. مع أن لمحاصلات أن اختبار KBM KHM مقتطف الإيتانول من أوراق الفالاتيكان لم تستطع إلى حد تنمية الفطر جانديد ألبكان. كل تركيز مستخدم تدل مجال تنمية الفطر جانديدي ألبكان. وأما المحاصلات لهذا البحث من فيتوكيمياء تظاهر ان المركب الفعالي الذي تتضمن في مقتطف الإيتانول من أوراق الفالاتيكان هو فلافونويد، تانين، فانين، و تريرفينويد. و أما اختبار KLT بيوتوغرافي، ان المركب الفعالي الذي يظهر إلى عملية حدود الفطر جانديدي ألبكان هو تريرفينويد.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Allah menciptakan alam semesta beserta isinya merupakan salah satu bukti kebesaran dan kasih sayangNya terhadap makhluk terutama manusia sebagaimana Allah menciptakan tumbuhan yang memberikan banyak manfaat. Hal ini sesuai dengan firman Allah dalam surat Thahaa ayat 53:

الَّذِي جَعَلَ لَكُمُ الْأَرْضَ مَهْدًا وَسَلَكَ لَكُمْ فِيهَا سُبُلًا وَأَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ
أَنْبُوتًا مِنْ نَبَاتٍ شَتَّى ﴿٥٣﴾

Artinya: “(Allah SWT) yang telah menjadikan bagimu bumi sebagai hamparan dan yang telah menjadikan bagimu di bumi itu jalan-jalan, dan menurunkan dari langit air hujan. Maka Kami tumbuhkan dengan air hujan itu berjenis-jenis dari tumbuh-tumbuhan yang bermacam-macam”.

Berdasarkan ayat tersebut dapat diketahui bahwa di dunia ini begitu banyak jenis tumbuhan yang tumbuh subur seperti di Indonesia. Keanekaragaman hayati tanaman yang dimiliki Indonesia merupakan sumber daya alam yang potensial untuk dimanfaatkan sebagai bahan baku obat tradisional dan salah satunya adalah tanaman plethekan (*Ruellia tuberosa* L). Tanaman plethekan merupakan tanaman yang mudah didapatkan, tersebar hampir di seluruh Indonesia dan dapat tumbuh secara liar ataupun dibudidayakan. Tanaman plethekan dikenal sebagai salah satu bahan baku obat tradisional yang dapat menyembuhkan berbagai penyakit, diantaranya sebagai antidiuretik, antihipertensi, analgesik, antidotal agen (Syamsuhidayat, 2000) antioksidan (Aktsar, 2012) antibakteri, antiinflamasi (Wuart, dkk., 2005) antikanker (Arun, dkk., 2008) antidiabetes dan dapat menurunkan glukosuria (Cintari, 2009). Namun, tak sedikit orang yang

masih menganggap bahwa plethekan hanyalah berupa gulma yang mengganggu, sehingga daun plethekan belum dimanfaatkan sebaik mungkin (Syamsuhidayat, 2000).

Efektivitas tanaman plethekan dalam mengobati beberapa penyakit disebabkan karena banyaknya senyawa aktif yang terkandung di dalamnya. Beberapa penelitian sebelumnya melaporkan kandungan senyawa kimia yang terdapat pada tanaman plethekan diantaranya senyawa steroid, triterpenoid, fenol, flavonoid, glukosa (Arirudran, dkk., 2011) dan tanin (Aktsar, 2012). Berdasarkan penelitian terdahulu beberapa senyawa tersebut diduga memiliki aktivitas antijamur. Dimana senyawa anti jamur umumnya terdapat pada senyawa fenol, terpenoid (Hariana, 2006), flavonoid, saponin dan alkaloid (Padmawinata, 1995). Beberapa penelitian mengenai senyawa antijamur terhadap jamur *Candida albicans* telah banyak dilakukan, yakni menggunakan berbagai jenis tanaman yang diekstrak dengan jenis pelarut yang berbeda, berikut diantaranya senyawa tanin dari fraksi aktif etil asetat belimbing wuluh (Marlin, dkk., 2015) senyawa terpenoid dari ekstrak petroleum eter seledri (Purwantini, dkk., 2000) senyawa fenol dari ekstrak n-heksan rimpang lengkuas putih (Salni, dkk., 2013).

Jamur merupakan penyakit infeksi yang erat kaitannya dengan kebiasaan dan tingkat kebersihan perorangan. Oleh karena itu, lingkungan yang padat oleh penduduk dengan sanitasi yang kurang dan tingkat sosial ekonomi rendah juga dapat memacu perkembangan infeksi jamur (Wattimena, dkk., 1991). Salah satu spesies jamur yang sering menyebabkan berbagai jenis infeksi adalah *Candida albicans*. *Candida albicans* merupakan penyebab utama infeksi kandidiasis vaginalis, yakni suatu infeksi genitalia pada perempuan yang sering menimbulkan

keluhan seperti rasa gatal, pedih disertai keluarnya cairan putih seperti krim susu atau biasa disebut dengan keputihan (Bindusari dan Suyoso, 2001). Penyakit ini merupakan masalah yang signifikan mewakili salah satu alasan paling sering bagi perempuan pada semua kelompok umur untuk berkunjung ke dokter (Eschenbach, 2004).

Saat ini banyak tersedia obat-obat antijamur dan salah satunya adalah ketokanzol. Ketokanzol mempunyai beberapa efek samping dari penggunaannya antara lain iritasi, gatal (Indriana, 2006) mual dan muntah (Bahri dan Setiabudy, 2011). Sehingga perlu dipikirkan alternatif terapi pada kandidiasis vaginalis. Salah satu alternatif yang dapat digunakan yakni dengan memanfaatkan tanaman-tanaman yang banyak mengandung senyawa aktif yang mampu berperan sebagai antijamur, mengingat penggunaan obat tradisional dianggap lebih aman dibandingkan obat antijamur sintetik karena mempunyai efek samping yang relatif lebih kecil bahkan ada yang tidak memiliki efek samping apabila digunakan secara tepat (Lathifah, 2008).

Senyawa antijamur dapat diperoleh dengan menggunakan metode ekstraksi. Pada penelitian ini akan digunakan metode ekstraksi maserasi, yaitu proses perendaman sampel dengan pelarut organik yang dilakukan pada suhu ruang tanpa adanya pemanasan (Darwis, 2000). Senyawa metabolit sekunder memiliki sifat yang berbeda-beda termasuk dalam hal ketahanannya terhadap suhu tinggi, beberapa senyawa dapat rusak apabila digunakan suhu yang tinggi, oleh sebab itu metode maserasi ini dianggap aman karena dilakukan pada suhu kamar. Selain itu pemilihan pelarut dalam ekstraksi juga merupakan faktor yang penting,

sehingga harus mempertimbangkan banyak hal dalam pemilihan pelarut yang akan digunakan untuk ekstraksi (Darwis, 2000).

Pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi harus memiliki tingkat kepolaran yang sesuai dengan senyawa yang akan diekstrak (Harbone, 1987) terutama senyawa yang bersifat sebagai antijamur. Berdasarkan penelitian Kader, dkk (2012) senyawa aktif yang mampu terekstrak dari akar pletheakan dengan pelarut metanol diantaranya flavonoid, steroid, triterpenoid dan alkaloid, sedangkan senyawa-senyawa tersebut diduga berpotensi sebagai antijamur (Harloiana, 2006 dan Padmawinata, 1995). Hal ini dibuktikan dari zona hambat yang terbentuk dari hasil uji aktivitas antijamur terhadap *Candida albicans* yang tergolong kuat (David, 2003). Sehingga pelarut metanol diduga efektif dalam mengekstrak senyawa antijamur khususnya *Candida albicans* dari daun pletheakan. Tapi pelarut metanol memiliki sifat toksik, sehingga pada penelitian ini akan digunakan etanol sebagai pelarut pengganti metanol yang dianggap lebih aman (Ramdja, dkk., 2009) dan bersifat lebih selektif, kapang dan bakteri sulit tumbuh dalam etanol (Hargono, dkk., 2000).

Pengujian aktivitas antijamur pada penelitian ini adalah dengan menggunakan metode difusi cakram. Metode difusi cakram merupakan metode yang paling sering digunakan karena sangat mudah untuk dilakukan, yakni tidak memerlukan peralatan khusus dan biaya yang dibutuhkan juga relatif sedikit (Pelezar, 1988). Hasil dari pengujian dengan metode ini dapat dilakukan dengan cara mengamati zona bening yang terbentuk disekitar kertas cakram, dimana luas zona bening yang terbentuk menunjukkan tingkat keberhasilan zat antijamur dalam menghambat jamur uji (David, 2003).

Penggunaan zat antijamur tidak boleh digunakan secara berlebihan karena dapat mengakibatkan resistensi terhadap zat tersebut, sehingga diperlukan pengujian Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan uji Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM). Berdasarkan uji KHM dan KBM ini dapat diketahui berapa konsentrasi minimum dari ekstrak daun plethekean yang dapat menghambat atau membunuh jamur uji. Berdasarkan penelitian Kader, dkk, (2012) yang menguji aktivitas antijamur dari ekstrak metanol akar plethekean terhadap beberapa jamur uji dengan menggunakan konsentrasi 25 µg/µl ditunjukkan bahwa ekstrak metanol akar plethekean memberikan aktivitas antijamur terbesar terhadap *Candida albicans* dibandingkan dengan jamur uji lainnya, yakni 18 mm (zona hambat kuat). Mengacu pada penelitian tersebut, sehingga penelitian ini akan digunakan variasi konsentrasi ekstrak uji dibawah konsentrasi 25 mg/mL untuk uji KHM dan KBM, yaitu 25, 20, 15 dan 10 mg/mL.

Jenis senyawa antijamur dapat diidentifikasi menggunakan metode KLT-bioautografi. KLT-bioautografi merupakan metode untuk mendeteksi bercak pada kromatogram hasil kromatografi lapis tipis yang memiliki aktivitas antimikroba (Pratiwi, 2008). Metode bioautografi penting untuk dilakukan guna mengetahui aktivitas biologi secara langsung dari senyawa kompleks, terutama yang terkait dengan kemampuan suatu senyawa untuk menghambat pertumbuhan mikroba (Kavanagh, 1972). Sehingga senyawa yang berperan sebagai antijamur dapat diketahui dari zona hambat yang terbentuk.

Ada tiga macam metode bioautografi yaitu: bioautografi kontak, bioautografi agar-overlay, bioautografi langsung dan ketiga metode tersebut memiliki kelebihan dan kekurangan masing-masing. Menurut Kusumaningtyas *et*

al. (2008) bioautografi *agar overlay* memiliki sensitivitas lebih baik dari pada metode yang lain. Akan tetapi, bioautografi kontak lebih mudah dilakukan dan hasilnya telah jelas terlihat. Sedangkan bioautografi langsung merupakan bioautografi yang jarang digunakan karena dilaporkan tidak dapat digunakan untuk sampel tertentu. Oleh karena itu pada penelitian ini akan digunakan metode bioautografi kontak.

Beberapa penelitian yang menguji aktivitas *Candida albicans* dengan metode KLT-bioautografi melaporkan beberapa senyawa aktif sebagai anti jamur berasal dari golongan senyawa yang berbeda. Efendi dan Hertiani (2013) melaporkan senyawa yang memiliki aktivitas antijamur dari ekstrak etanol sarang semut adalah senyawa fenol. Mangunwardoyo, dkk (2009) melaporkan senyawa yang memiliki aktivitas antijamur dari ekstrak etanol herba meniran adalah alkaloid dan taninnamun hasil KLT yang terbentuk kurang baik (terbentuk *tailing*). Menurut penelitian Raharjo, dkk (2012) senyawa yang memiliki aktivitas antijamur dari ekstrak etanol daun kelor adalah flavonoid dan saponin.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan kader, dkk (2012) akar dari tumbuhan plethekan memang berkhasiat sebagai antijamur khususnya *Candida albicans*. Namun belum ada penelitian yang menggunakan daun plethekan sebagai bahan uji untuk uji aktivitas antijamur, juga senyawa yang memiliki aktivitas sebagai antijamur dari tanaman plethekan masih belum diketahui. Mengingat daun dan akar yang digunakan berasal dari bagian tanaman yang sama yakni plethekan sehingga dimungkinkan kandungan senyawa aktif dalam daun plethekan juga berpotensi sebagai senyawa antijamur. Hal tersebut yang menjadi alasan dilakukan uji aktivitas antijamur daun plethekan secara *in vitro* terhadap *Candida*

albicans juga uji KHM dan KBM serta profil bioautografinya guna mendapatkan data teoritis dan bukti ilmiah tentang pemanfaatan tanaman *Ruellia tuberosa* sebagai antijamur.

1.2 Rumusan Masalah.

Adapun rumusan masalah dalam penelitian ini antara lain:

1. Bagaimana aktivitas antijamur ekstrak etanol daun plethekan terhadap *Candida albicans*?
2. Berapakah Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ekstrak etanol daun plethekan terhadap jamur *Candida albicans*?
3. Golongan senyawa aktif apa yang terkandung dalam ekstrak etanol daun plethekan yang berperan sebagai antijamur berdasarkan uji KLT-bioautografi?

1.3 Tujuan.

Adapun tujuan dalam penelitian ini anatara lain:

1. Mengetahui aktivitas ekstrak etanol daun plethekan terhadap *Candida albicans*
2. Mengetahui konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ekstrak etanol daun plethekan terhadap jamur *Candida albicans*
3. Mengetahui golongan senyawa pada ekstrak etanol daun plethekan yang berperan sebagai antijamur berdasarkan uji KLT-bioautografi

1.4 Batasan Masalah

Adapun batasan masalah pada penelitian ini adalah:

1. Sampel yang digunakan adalah daun plethekan (*Ruellia tuberosa* L) yang di dapatkan dari Materia Medica, Batu, Malang
2. Jamur uji yang akan digunakan adalah jamur *Candida albicans* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, Teknik Pertanian Universitas Brawijaya
3. Metode ekstraksi yang digunakan pada penelitian ini adalah metode ekstraksi maserasi dengan menggunakan pelrut etanol
4. Uji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dilakukan pada konsentasi 10, 15, 20 dan 25 mg/ml

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi kepada peneliti tentang pemanfaatan ekstrak daun *Ruellia tuberosa* L sebagai antijamur sehingga dapat digunakan sebagai alternatif untuk pengobatan infeksi kandidiasis vaginalis yang lebih efisien dan lebih murah.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Plethekan (*Ruellia tuberosa* L.)

Tanaman plethekan (*Ruellia tuberosa* L.) sering dikenal dengan nama pletekan, pletikan, ceplikan, pletesan oleh masyarakat luas. Plethekan merupakan herba tegak yang sering dijumpai tumbuh liar di berbagai tempat yang tak terurus. Daun plethekan (*Ruellia tuberosa* L.) berasal dari Hindia Barat dan menyebar di berbagai Negara, karena plethekan dapat bertahan hidup di berbagai kondisi lingkungan. Batang tumbuhan ini berdiri tegak dengan pangkal sedikit berbaring, bersegi, massif, serta hijau. Daun berbentuk solet, ujung membulat, pangkal runcing, tepi bergigi yang memiliki panjang mencapai 6-18 cm, lebar 3-9 cm yang tersusun secara bersilang berhadapan dan tulang daun menyirip. Bunga majemuknya berwarna ungu diketiak daun dengan dasar mahkota membentuk tabung. Buah matang, dalam polong dengan 7-8 biji masing-masing, meledak terbuka dengan keras, ketika mereka basah dan biji hitam melompatinya pergi. (Ulah, dkk. 2011).

Tanaman plethekan secara taksonomi mempunyai klasifikasi ilmiah sebagai berikut (Ditjen POM, 2009):

Kingdom	: Plantae (Tumbuhan)
Subkingdom	: Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
Divisi	: Spermatophyta (Menghasilkan biji)
Super Divisi	: Spermatophyta (Tumbuhan berbunga)
Kelas	: Magnoliopsida / Dicotyledoneae (berkeping dua / dikotil)
Sub Kelas	: Asteridae
Ordo	: Scrophulariales
Famili	: Acanthaceae
Genus	: <i>Ruellia</i>
Spesies	: <i>Ruellia tuberosa</i> L.



Gambar 2.1 Tanaman plethekean (*Ruellia tuberosa* L.) (Amelia, 2015)

2.1.2 Kandungan Kimia Tanaman Plethekean

Daun dan akar tumbuhan plethekean mengandung saponin. Saponin merupakan kelompok senyawa dalam bentuk glikosida terpenoid atau steroid. Pembentukan busa yang mantap sewaktu mengekstraksi tumbuhan atau waktu memekatnya ekstrak tumbuhan merupakan bukti adanya saponin. Disamping itu, daunnya juga mengandung polifenol dan akarnya mengandung flavonoida. Plethekean dapat dikembangkan sebagai antioksidan yang efektif untuk melawan beberapa penyakit degenerasi oksidatif seperti kanker ataupun penyakit liver yang merupakan pemicu timbulnya diabetes mellitus (Arirudran, dkk., 2011). Pada penelitian lain disebutkan bahwa dalam ekstrak n-heksana tanaman plethekean terkandung senyawa steroid dan triterpenoid. Pada ekstrak kloroformnya terkandung senyawa steroid, triterpenoid dan fenol. Sedangkan pada ekstrak etil asetat, alkohol dan air terkandung senyawa steroid, triterpenoid, fenol, flavonoid, tanin dan glukosa (Arirudran, dkk., 2011).

2.1.2 Khasiat Tanaman Plethekean

Tanaman plethekean berkhasiat sebagai obat alami untuk membantu mengurangi peradangan, panas, demam, nyeri, asma, impotensi pria, dan diabetes. Plethekean juga dapat membantu mengurangi gas dalam sistem pencernaan, dan meredakan sakit perut yang terkait. Akarnya digunakan untuk mengobati sakit

perut, sakit gigi, pilek, heartburn, hipertensi, infeksi saluran kemih dan diabetes tipe 1 maupun tipe 2 (Bram, 2014). Secara tradisional, bubuk akar daun plethekan yang telah dijemur sampai benar-benar kering dibawah terik matahari dapat digunakan untuk menyembuhkan luka lambung dan usus dua belas jari. Akarnya juga dapat dibuat untuk mengobati batu ginjal dan infeksi saluran kemih (Bram, 2014).

Manfaat plethekan ini dapat dijadikan acuan dalam pengembangan alternatif obat baru, sebagaimana sabda Rosulullah SAW yang diriwayatkan oleh Abu Dawud dalam *Sunan-nya* (Kitab *Ath-Thibb*):

إِنَّ اللَّهَ أَنْزَلَ الدَّاءَ وَالدَّوَاءَ، وَجَعَلَ لِكُلِّ دَاءٍ دَوَاءً فَتَدَاوُوا وَلَا تَدَاوُوا بِحَرَامٍ

Artinya: “Sesungguhnya Allah menurunkan penyakit beserta obatnya, dan menciptakan obat untuk setiap penyakit, maka berobatlah kalian namun jangan berobat dengan yang haram” (HR. Abu Dawud) (An-Najjar, 2006)

Menurut Qardhawi (1998), menerangkan bahwa Ibnu Qayyim menulis dalam *Zadul-Ma’ad* bahwa sabda Rasul “untuk setiap penyakit itu ada obatnya”, merupakan penguat bagi setiap orang dan merupakan dorongan untuk terus mencari obat untuk mencarinya dan menelitinya. Penjelasan hadits tersebut memberikan pesan kepada manusia untuk meyakini bahwa Allah menurunkan penyakit begitu pula dengan obatnya, sehingga sebagai umat islam, disamping terus beriman kepada Allah SWT. juga harus berusaha mencari obat dari penyakitnya bahkan melakukan penelitian terhadap sesuatu yang berpotensi sebagai obat, sebagaimana manfaat daun plethekan yang dapat dijadikan sebagai obat. Diantara manfaat lain dari daun plethekan adalah ekstrak metanol daun

plethekan mampu menghambat pertumbuhan jamur *Penicillium* sp, *Mucor* sp, *Trichoderma* sp dan *Aspergillus* sp (Senthilkumar, Sambath dan Vasantharaj, 2013).

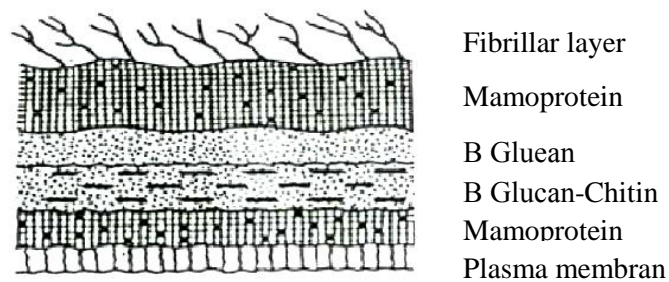
2.2 Jamur *Candida Albicans*

Taksonomi jamur *Candida albicans* menurut Dumilah (1992) adalah sebagai berikut:

Divisi	: Eumycotina
Class	: Deuteromycetes
Ordo	: Moniliales
Famili	: Cryptococcaceae
Sub Familia	: Candidoidea
Genus	: <i>Candida</i>
Species	: <i>Candida Albicans</i>

Candida albicans adalah jamur yang tumbuh sebagai sel-sel ragi bertunas dan oval dengan diameter 3-6 μm . *Candida albicans* merupakan anggota flora normal di kulit, membran mukosa, dan saluran pencernaan (Brooks, 2005). *Candida Albicans* secara mikroskopis berbentuk oval dengan ukuran 2-5 x 3-6 mikron. Biasanya dijumpai *Clamydospora* yang tidak ditemukan pada spesies *Candida* yang lain dan merupakan pembeda pada spesies tersebut, hanya *Candida Albicans* yang mampu menghasilkan *Clamydospora* yaitu spora yang dibentuk karena hifa, pada tempat-tempat tertentu membesar, membulat dan dinding menebal, letaknya di terminal, lateral (Jawetz, 2004)

Dinding sel *candida albicans* terdiri dari lima lapisan yang berbeda dan kompleks dengan tebal dinding sel 100-300 nm. Dinding sel *candida albicans* berfungsi untuk memberi bentuk pada sel. Melindungi ragi dari lingkungannya berperan dalam proses penempelan dan kolonisasi serta bersifat antigenik. Dinding sel tersebut yang merupakan target dari beberapa antimikotik (Tjampakasari, 2006).

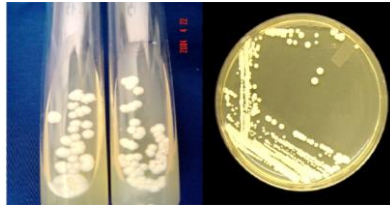


Gambar 2.2 Struktur dinding sel *Candida albicans* (Tjampakasari, 2006)

Candida albicans dapat dibedakan dari dari spesies lain berdasarkan kemampuan melakukan proses fermentasi dan asimilasi. Pada kedua proses ini dibutuhkan karbohidrat sebagai sumber karbon. Pada proses fermentasi, jamur ini menunjukkan hasil terbentuknya gas dan asam pada glukosa dan maltosa, terbentuknya asam pada sukrosa dan tidak terbentuknya asam dan gas pada laktosa. Pada proses asimilasi menunjukkan adanya pertumbuhan pada glukosa, maltosa dan sukrosa namun tidak menunjukkan pertumbuhan pada laktosa (Tjampakasari, 2006)

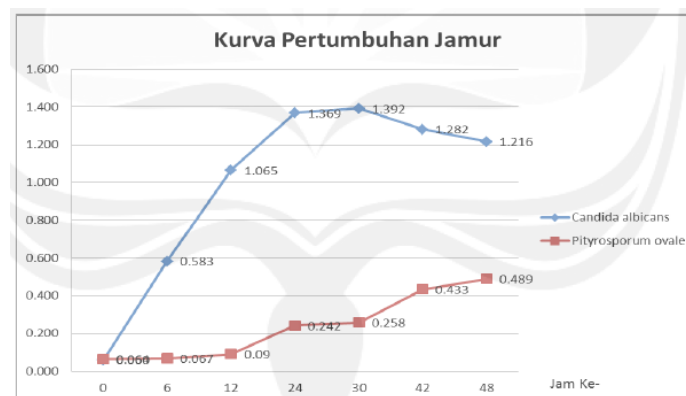
2.2.1 Biakan *Candida Albicans*

Candida Albicans dibiakkan pada media Sabouraud Dextrose Agar (SDA) yang diinkubasi selama 24 jam pada suhu kamar, berbentuk koloni-koloni lunak berwarna coklat yang mempunyai bau seperti ragi. Pertumbuhan permukaan terdiri atas sel-sel bertunas lonjong. Pertumbuhan di bawahnya terdiri atas pseudomiselium (massa pseudohifa) yang membentuk blastospora pada nodus-nodus dan kadang-kadang klamidospora pada ujung-ujungnya (Jawetz, dkk., 1995).



Gambar 2.3 Kultur *Candida albicans* pada media SDA (Jawetz, dkk1995)

Pembentukan kecambah dari blastospora sebagai perpanjangan filamentosa “(Germ Tube Test)” dalam waktu inkubasi 1-2 jam pada suhu 37°C dijumpai pada media yang mengandung faktor protein misalnya putih telur, serum atau plasma darah (Dumilah, 1992). Pembentukan klamidospora yaitu spora aseksual pada bagian tengah atau ujung hifa yang membentuk dinding tebal, dijumpai pada media Corn Meal Agar (Jawetz, 2004)



Gambar 2.4 Kurva pertumbuhan jamur *Candida albicans* (Arundhina, 2014)

Kurva pertumbuhan jamur *Candida albicans* (Gandjar, dkk., 2006):

- Fase lag: yaitu fase penyesuaian sel-sel dengan lingkungan, sel-sel mulai membesar karena imbisi dan menyerap nutrisi
- Fase akselerasi: yaitu fase mulainya sel-sel membelah dan menjadi aktif

- c. Fase eksponensial: yaitu fase perbanyak jumlah sel yang sangat banyak, aktivitas sel meningkat dan fase ini merupakan fase yang penting dalam kehidupan fungi
- d. Fase deselerasi (Moore-Landeker, 1996): yaitu waktu sel-sel mulai kurang aktif membelah
- e. Fase stasioner: yaitu fase jumlah sel yang bertambah dan jumlah sel yang mati relatif seimbang
- f. Fase kematian: yaitu fase jumlah sel-sel yang mati/ tidakaktif sama sekali lebih banyak daripada sel-sel yang masih hidup

2.2.2 Virulensi *Candida albicans*

Faktor virulensi *Candida* yang menentukan adalah dinding sel. Dinding sel merupakan bagian yang berinteraksi langsung dengan sel penjamu. Dinding sel *Candida* mengandung zat yang penting untuk virulensinya, antara lain turunan manoprotein yang mempunyai sifat immunosupresif sehingga mempertinggi pertahanan jamur terhadap imunitas penjamu. *Candida* tidak hanya menempel, namun juga penetrasi ke dalam mukosa. Enzim proteinase aspartil membantu *Candida* pada tahap awal invasi jaringan untuk menembus lapisan mukokutan yang berkeratin. Dinding sel berperan pula dalam proses penempelan dan kolonisasi serta bersifat antigenik. Fungsi utama dinding sel tersebut adalah memberi bentuk pada sel dan melindungi sel ragi dari lingkungannya. *Candida albicans* mempunyai struktur dinding sel yang kompleks, tebalnya 100 sampai 400 nm.

Penyakit yang disebabkan oleh *Candida albicans* dapat dibagi atas kandidiasis selaput lendir, kandidiasis kutis, kandidiasis sistemik, dan reaksi id

(Candidid). Pada kandidiasis oral terlihat mukosa yang berwarna merah yang diselubungi bercak-bercak putih. Bercak-bercak putih ini biasanya bersifat asimtomatik, tetapi dapat juga diikuti dengan perasaan terbakar (burning sensation). Lesi dapat berbentuk difus maupun lokal, bersifat erosif, dan berbentuk seperti pseudomembran. Kandidiasis yang telah masuk ke dalam aliran darah dapat menyebar ke berbagai organ seperti ginjal, limpa, jantung, otak, dan menimbulkan berbagai penyakit seperti endokarditis, meningitis, endophtalmitis dan pielonefritis.

2.2.3 Patogenitas

Candida albicans merupakan jamur oportunistik. *Candida Albicans* merupakan spesies yang paling patogen yang menyerang permukaan kulit, makrosa mulut dan vagina. (Dumilah, 1992). Untuk bisa menginfeksi, perlu faktor predisposisi atau keadaan yang menguntungkan untuk pertumbuhan jamur. Faktor predisposisi yang dihubungkan dengan meningkatnya insiden kandidiasis antara lain:

1. Faktor Endogen

- a. Perubahan fisiologis, seperti kehamilan, kegemukan, debilitas, endokinoprati dan penyakit kronis
- b. Umur, misalnya orang tua dan bayi yang yang lebih rentan terserang.
- c. Imunologik/ penyakit genetik

2. Faktor Eksogen

- a. Iklim, panas dan kelembaban menyebabkan perspirasi meningkat
- b. Kebersihan kulit
- c. Kontak dengan pasien, misalnya pada thrush, balanopostitis.

- d. Iatogenik, misalnya dengan penggunaan antibiotik jangka panjang (Mansjoer, dkk., 2000)

2.2.4 Gambaran klinik

Kandidiasis vaginalis merupakan infeksi primer atau sekunder oleh genus *Candida* yang umumnya disebabkan oleh *Candida albicans* yaitu 80-90%. Gambaran klinik sangat bervariasi mulai dari bentuk eksematoid dengan hiperemi ringan sampai gejala klinik berat yang berupa eksoriasi dan ulkus pada labia minor, introitus vagina, dan dinding vagina. Keluhan lain berupa rasa gatal, pedih disertai keluarnya cairan putih seperti krim susu. Gejala-gejala diatas oleh masyarakat dikenal dengan terjadinya penyakit keputihan (Brooks, 2005)

2.3 Senyawa Antijamur

Antijamur merupakan zat berkhasiat yang digunakan untuk penanganan penyakit jamur. Umumnya suatu senyawa dikatakan sebagai zat antijamur apabila senyawa tersebut mampu menghambat pertumbuhan jamur (Siswandono, 1995). Zat antijamur bekerja menurut salah satu dari berbagai cara, antara lain menyebabkan kerusakan dinding sel, perubahan permeabilitas sel, perubahan molekul protein dan asam nukleat, penghambatan kerja enzim, atau penghambatan sintesis asam nukleat dan protein. Kerusakan pada salah satu situs ini dapat mengawali terjadinya perubahan-perubahan yang menuju pada matinya sel tersebut (Pelezar dan Chan, 1998).

a. Kerusakan pada dinding sel

Dinding sel merupakan penutup lindung bagi sel lin juga berpartisipasi didalam proses-proses fisiologi tertentu. Strukturnya dapat dirusak dengan cara

menghambat pembentukannya atau mengubah setelah selesai terbentuk (Pelezar dan Chan, 1988).

b. Perubahan permeabilitas sel

Membran sitoplasma mempertahankan bahan-bahan tertentu di dalam sel serta secara selektif mengatur aliran keluar-masuknya zat antara sel dengan lingkungan luarnya. Membran memelihara integritas komponen-komponen seluler. Membran ini juga merupakan situs beberapa reaksi enzim. Kerusakan pada membran ini akan mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan sel atau matinya sel (Pelezar dan Chan, 1988).

c. Perubahan molekul protein dan asam nukleat

Hidupnya suatu sel bergantung pada terpeliharanya molekul-molekul protein dan asam nukleat pada membran alamiahnya. Suatu kondisi atau substansi yang mengubah keadaan ini yaitu mendenaturasikan protein dan asam-asam nukleat dapat merusak sel tanpa dapat diperbaiki kembali. Suhu tinggi dan konsentrasi pekat beberapa zat kimia dapat mengakibatkan koagulasi (denaturasi) ireversibel (tak dapat balik) komponen-komponen seluler yang vital ini (Pelezar dan Chan, 1988).

d. Penghambatan kerja enzim

Setiap enzim dari beratus-ratus enzim berbeda-beda yang ada di dalam sel merupakan sasaran potensial bagi bekerjanya suatu penghambat. Banyaknya zat kimia telah diketahui dapat mengganggu reaksi biokimiawi. Penghambatan ini dapat mengakibatkan terganggunya metabolisme atau matinya sel (Pelezar dan Chan, 1988)

e. Penghambatan sintesis asam nukleat dan protein

DNA, RNA dan protein memegang peranan sangat penting di dalam proses kehidupan normal sel. Hal ini berarti bahwa gangguan apapun yang terjadi pada pembentukan atau pada fungsi zat-zat tersebut dapat mengakibatkan kerusakan total pada sel (Pelezar dan Chan, 1988)

2.4 Metode Pengujian Aktivitas Antijamur

Uji senyawa antijamur adalah uji untuk mengetahui apakah suatu senyawa uji dapat menghambat pertumbuhan jamur dengan mengukur respon pertumbuhan populasi mikroorganisme (jamur) terhadap agen antijamur (Pratiwi, 2008). Beberapa metode uji antijamur diantaranya adalah metode difusi dan metode dilusi. Metode difusi merupakan salah satu metode yang sering digunakan dalam uji antimikroba. Metode difusi dapat dilakukan 3 cara yaitu metode silinder, lubang dan cakram kertas. Metode silinder yaitu meletakkan beberapa silinder yang terbuat dari gelas atau besi tahan karat diatas media yang telah diinokulasi dengan jamur. Tiap silinder ditempatkan sedemikian rupa hingga berdiri diatas media agar, diisi dengan larutan yang akan diuji dan diinkubasi. Metode lubang (sumuran) yaitu membuat lubang pada agar padat yang telah diinokulasi dengan jamur. Jumlah dan letak lubang disesuaikan dengan tujuan penelitian, kemudian lubang diisi dengan larutan yang akan diuji. Metode cakram kertas yaitu meletakkan kertas cakram yang telah direndam larutan uji di atas media padat yang telah diinokulasi dengan jamur (Kusmiyati, 2007).

Sedangkan metode dilusi dibuat dengan cara larutan uji diencerkan hingga diperoleh beberapa konsentrasi, kemudian masing-masing konsentrasi larutan uji ditambahkan suspensi jamur dalam media. Pada dilusi padat, tiap konsentrasi larutan uji dicampurkan kedalam media agar. Setelah padat kemudian ditanami

jamur (Hugo dan Russel, 1987). Metode dilusi biasanya digunakan untuk menentukan kadar hambat minimum dan kadar bunuh minimum dari bahan antimikroba. Prinsip dari metode dilusi menggunakan satu seri tabung reaksi yang diisi medium cair dan sejumlah tertentu sel mikroba yang diuji. Selanjutnya masing-masing tabung diisi dengan bahan antijamur yang telah diencerkan secara serial, kemudian seri tabung diinkubasi pada suhu 37° C selama 18-24 jam dan diamati terjadinya kekeruhan konsentrasi terendah bahan antimikroba pada tabung yang ditunjukkan dengan hasil biakan yang mulai tampak jernih (tidak ada pertumbuhan jamur merupakan konsentrasi hambatminimum). Biakan dari semua tabung yang jernih ditumbuhkan pada medium agar padat, diinkubasi selama 24 jam dan diamati ada tidaknya koloni jamur yang tumbuh. Konsentrasi terendah bahan antijamur pada biakan medium padat yang ditunjukkan dengan tidak adanya pertumbuhan jamur merupakan konsentrasi bunuh minimum bahan antijamur terhadap jamur uji (Tortora *et al*, 2001)

Beberapa penelitian mengenai uji aktivitas antijamur terhadap *Candida albicans* dengan metode difusi cakram telah dilakukan. Purwantini dan Wahyuno (2002) melaporkan zona hambat yang terbentuk dari ekstrak petroleum eter kulit buah delima sebesar 12,05 mm. Salni, dkk (2013) melaporkan zona hambat yang terbentuk dari ekstrak aktif n-heksana rimpang lengkuas putih sebesar 31,67 mm. Marlin, dkk (2015) melaporkan zona hambat yang terbentuk dari fraksi aktif etil asetat belimbing wuluh sebesar 13.00 mm. Purwantini, dkk (2002) melaporkan zona hambat yang terbentuk dari ekstrak etanol sarang semut sebesar 6.67 mm.

Uji aktivitas antijamur yang telah dilakukan dengan tanaman plethekan sendiri telah dilakukan oleh Kader, dkk (2012) dimana zona hambat yang

terbentuk dari ekstrak metanol akar plethekan (*Ruellia tuberosa L.*) sebesar 18 mm. zona hambat yang terbentuk tergolong dalam zona hambat yang kuat karena berada pada kisaran 10-20 mm. Uji aktivitas antijamurnya dilakukan terhadap jamur *Candida albicans* dengan menggunakan metode difusi cakram kertas.

Faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas zat antimikroba (Pelczar. 1986):

1. Konsentrasi atau intensitas zat anti

Semakin tinggi konsentrasi suatu zat antimikroba, maka semakin tinggi daya antimikrobanya. Asrtinya, banyak mikroba yang akan terbunuh lebih cepat bila konsentrasi zat tersebut lebih tinggi

2. Jumlah mikroorganisme

Semakin banyak jumlah mikroorganisme yang ada, makasemakin banyak pula waktu yang diperlukan untuk membunuhnya

3. Spesies mikroorganisme

Spesies mikroorganisme menunjukkan ketahanan yang berbeda-beda terhadap suatu bahan kimia tertentu

4. Suhu

Kenaikan suhu dapat meningkatkan keefektifan suatu disinfektan atau bahan mikrobial. Hal ini disebabkan zat kimia merusak mikroorganisme melalui reaksi kimia. Reaksi kimia bisa dipercepat dengan meninggikan suhu

5. Keasaman atau Kebasaan (pH)

Mikroorganisme yang hidup pada pH asam akan lebih mudah dibasmi pada suhu rendah dan dalam waktu yang singkat bila dibandingkan dengan mikroorganisme yang hidup pada pH basa.

2.5 Ekstraksi Maserasi

Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (Indraswari, 2008). Pada umumnya ekstraksi akan bertambah baik bila permukaan serbuk simplisia bersentuhan dengan pelarut maka makin baik, tetapi dalam pelaksanaannya tidak selalu demikian karena ekstraksi masih bergantung juga pada sifat fisik dan kimia simplisia yang bersangkutan (Prawesti, 2008). Metode pembuatan pembuatan ekstrak yang dapat digunakan adalah maserasi, perkolasi dan soxhlet (Ansel, 1995 dalam Prawesti, 2008)

Maserasi berasal dari bahasa latin *macerare*, yang artinya “merendam”. Maserasi merupakan cara penyarian yang sederhana. Maserasi merupakan ekstraksi cair-cair yang dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari. Caran penyari akan menembus dinding sel dan masuk kedalam rongga sel yang mengandung zat aktif dan zat aktif akan larut (Ansel, 1995 dalam Prawesti, 2008). Simplisia yang akan diekstraksi ditempatkan pada wadah atau bejana yang bermulut lebar bersama larutan penyari yang telah ditetapkan, bejana ditutup rapat kemudian dikocok berulang-ulang sehingga memungkinkan pelarut masuk ke seluruh permukaan simplisia. Rendaman tersebut disimpan terlindung dari cahaya langsung (mencegah reaksi yang dikatalisis oleh cahaya atau perubahan warna). Waktu maserasi pada umumnya 5 hari (Voihgt, 1994 dalam Indraswari, 2008), setelah waktu tersebut keseimbangan antara bahan yang diekstraksi pada bagian dalam sel dengan luar sel telah tercapai. Dengan

pengocokan, keseimbangan konsentrasi bahan ekstraksi lebih cepat dalam cairan. Keadaan diam selama maserasi menyebabkan turunnya perpindahan bahan aktif.

Pemilihan pelarut mempertimbangkan banyak faktor. Pelarut yang baik harus memenuhi kriteria yaitu murah dan mudah diperoleh, stabil secara fisika dan kimia, bereaksi netral, tidak mudah menguap, tidak mudah terbakar, selektif yaitu hanya menarik zat berkhasiat yang dikehendaki, tidak mempengaruhi zat berkhasiat. Pelarut yang sering digunakan adalah pelarut cair eter, etanol, dan air (Prawesti, 2008)

Widodo (2007) mengatakan bahwa metode maserasi ini sangat menguntungkan karena pengaruh suhu dapat dihindari, suhu yang tinggi kemungkinan akan mengakibatkan terdegradasinya senyawa-senyawa metabolit sekunder. Pemilihan pelarut yang digunakan untuk proses maserasi akan memberikan efektivitas yang tinggi dengan memperhatikan kelarutan senyawa bahan alam dalam pelarut akibat kontak langsung dan waktu yang cukup lama dengan sampel.

Secara umum pelarut-pelarut golongan alkohol merupakan pelarut yang paling banyak digunakan dalam proses isolasi senyawa organik bahan alam, karena dapat melarutkan seluruh senyawa metabolit sekunder. Sifat kelarutan zat didasarkan pada *like dissolve like*, zat yang bersifat polar akan larut dalam pelarut polar dan zat yang bersifat nonpolar akan larut dalam pelarut nonpolar (Khopkar, 2003).

Kepolaran suatu pelarut menunjukkan tingkat kelarutan pelarut air ataupun pelarut organik terhadap suatu bahan. Kepolaran ini berawal dari perbedaan dua kutub (pole) kelarutan. Kecenderungan suatu bahan yang lebih larut dalam air

disebut polar dan jika kecenderungan suatu bahan yang lebih larut kedalam pelarut organik disebut nonpolar (Effendy, 2006).

Ekstraksi terhadap tanaman plethehan telah dilakukan dengan beberapa metode. Senthilkumar, dkk (2013) melaporkan senyawa yang terkandung dalam ekstrak metanol daun plethehan yang diekstraksi dengan menggunakan metode soxhlet yakni alkaloid, glikosida, terpenoid, tanin dan triterpenoid. Sedangkan Arirudran, dkk (2011) yang menguji farmakognostik dan studi awal fitokimia tanaman plethehan menggunakan metode ekstraksi maserasi melaporkan bahwa dalam ekstrak etil asetat, alkohol dan air tanaman plethehan mengandung senyawa steroid, triterpenoid, fenol, flavonoid, tanin, dan glukosa. Dalam ekstrak kloroformnya terkandung senyawa steroid, triterpenoid dan fenol. Sedangkan pada ekstrak n-heksana terkandung senyawa steroid, triterpenoid dan fenol.

2.6 Uji Fitokimia

Keanekaragaman hayati yang ada di bumi ini tidak lepas dari kandungan senyawa kimia yang ada di tanaman-tanaman itu sendiri. Tanaman yang berbeda mengandung senyawa yang berbeda pula. Perbedaan kandungan dan kadar senyawa inilah yang membuat setiap tanaman berbeda antara satu dengan lainnya. Sebagaimana firman Allah SWT. dalam surat An-Nahl ayat 11:

يُنَبِّتُ لَكُمْ بِهِ الزَّرْعَ وَالزَّيْتُونَ وَالنَّخِيلَ وَالْأَعْنَابَ وَمِنْ كُلِّ الثَّمَرَاتِ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً
لِّقَوْمٍ يَتَفَكَّرُونَ ﴿١١﴾

Artinya: Dia menumbuhkan bagi kamu dengan air hujan itu tanam-tanaman; zaitun, korma, anggur dan segala macam buah-buahan. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar ada tanda (kekuasaan Allah) bagi kaum yang memikirkan.

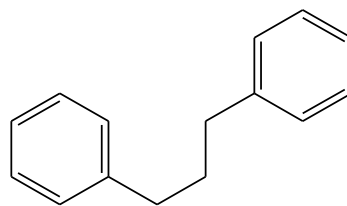
Penjelasan berdasarkan tafsir Al-Maraghi dari ayat tersebut bahwa Allah lah yang menumbuhkan dengan air yang diturunkan dari langit itu tanaman, zaitun, kurma, anggur dan buah-buahan lain yang mempunyai berbagai bentuk, warna, ciri khas dan tabiat masing-masing sebagai rezeki dan makanan pokok bagi kalian agar menjadi nikmat bagi kalian dan hujjah atas orang yang kafir kepada-Nya (Al-Maraghi, 1987:106).

Segala macam tumbuh-tumbuhan yang diciptakan Allah sebagai penghasil pemenuhan kebutuhan hidup manusia memiliki manfaat tersendiri berdasarkan kandungan zat aktif yang terkandung di dalamnya. Di dalam tanaman mungkin terkandung ratusan atau lebih dari jenis bahan kimia, sehingga sulit untuk menentukan jenis dan fungsi atau manfaat setiap jenis kandungan bahan aktif tersebut (Nasih, 2010). Dikenal suatu kelompok bahan aktif yang disebut “Produk Metabolit Sekunder” dimana fungsinya bagi tumbuhan tersebut dalam metabolisnya kurang jelas. Namun, kelompok ini dikenal berperan dalam hal berinteraksi atau berkompetisi, termasuk menjadi bahan untuk melindungi diri dari gangguan pesaingnya (Kardian, 2003). Berikut golongan senyawa aktif dalam tanaman yang berperan sebagai metabolit sekunder, diantaranya flavonoid, tanin, saponin, steroid, terpenoid, fenol, dan alkaloid. Salah satu cara untuk mengidentifikasi kandungan senyawa senyawa tersebut dalam tanaman adalah dengan melakukan uji fitokimia.

2.6.1 Flavonoid

Flavonoid termasuk dalam golongan senyawa fenol yang memiliki banyak gugus –OH dengan adanya perbedaan keelektronegatifan yang tinggi, sehingga sifatnya polar. Flavonoid dapat berefek antibakteri melalui kemampuan untuk

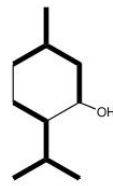
membentuk kompleks dengan protein ekstraseluler dan protein yang dapat larut serta dengan dinding sel bakteri (Robinson, 1995). Flavonoid disintesis oleh tanaman sebagai respon terhadap infeksi mikroba, jadi secara *in vitro* flavonoid efektif sebagai substansi antijamur antimikroba yang membunuh banyak mikroorganisme. Kemungkinan aktivitasnya dikarenakan kemampuan flavonoid membentuk ikatan dengan protein terlarut dan dinding sel bakteri, semakin lipofilik suatu flavonoid semakin merusak membran mikroba (Cowan, 1999)



Gambar 2.5 Struktur inti senyawa flavonoid (Robinson, 1995)

2.6.2 Terpenoid

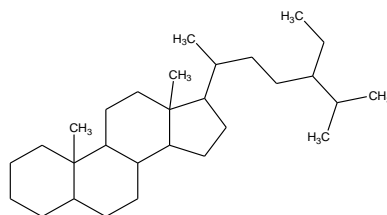
Secara kimia terpenoid larut dalam lemak dan terdapat di dalam sitoplasma sel tumbuhan (Harbone, 1996). Kebanyakan peneliti berpendapat bahwa fungsi terpenoid rendah dalam tumbuhan, lebih bersifat ekologi daripada fisiologi. Banyak senyawa ini yang menghambat pertumbuhan tumbuhan pesaingnya dan dapat bekerja sebagai insektisida atau berdaya racun terhadap hewan tinggi (Robinson, 1995). Salah satu senyawa terpenoid yang mempunyai aktivitas antijamur adalah (R)-6-[(Z)-1-heptenil]-5,6-dihidro-2H-piran-2-one yang diisolasi dari *Hyptis ovalifolia* Benth. Senyawa ini menunjukkan aktivitas antijamur secara *in vitro* terhadap *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Tricophyton mentagrophytes*, dan *Tricophyton rubrum*.



Gambar 2.6 Struktur inti senyawa terpenoid (senyawa mentol) (Robinson, 1995)

2.6.3 Steroid

Steroid merupakan golongan lipid yang diturunkan dari senyawa jenuh yang dinamakan siklopentanoperhidrofenantrena, yang memiliki inti dengan 3 cincin sikloheksana terpadu dan 1 cincin siklopentana yang tergabung pada ujung cincin sikloheksana tersebut. Beberapa turunan steroid yang penting ialah steroid alkohol dan sterol. Steroid lain antara lain asam-asam empedu, hormon seks (androgen dan estrogen) dan hormon kortikosteroid (Poedjiadi, 1994). Senyawa steroid terdapat dalam semua makhluk hidup. Steroid yang ditemukan dalam jaringan tumbuhan disebut fitosterol, sedangkan yang ditemukan dalam jaringan hewan disebut kolesterol (Robinson, 1995). Reaksi warna yang digunakan untuk uji warna pada steroid adalah dengan reaksi Liebermann-Burchard yang menghasilkan warna hijau biru (Robinson, 1995).

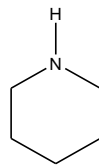


Gambar 2.7 Struktur inti senyawa steroid (Robinson, 1995)

2.6.4 Alkaloid

Alkaloid memiliki kemampuan sebagai antibakteri. Mekanisme yang diduga adalah dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada

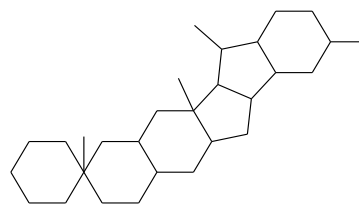
sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut (Robinson, 1995). Golongan alkaloid dapat diidentifikasi dengan menggunakan pereaksi dragendrof (Kalium tetraiodobismutat) dan pereaksi meyer (Kalium tetraiodomerkurat). Endapan terbentuk karena adanya pembentukan kompleks antara ion logam dari reagen dengan senyawa alkaloid.



Gambar 2.8 Struktur inti senyawa alkaloid (Robinson, 1995)

2.6.5 Saponin

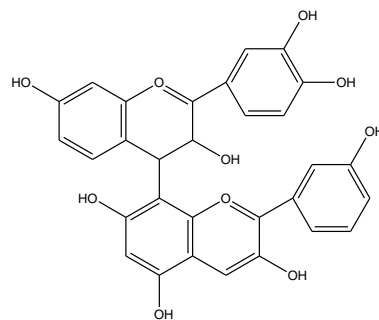
Saponin adalah suatu glikosida yang mungkin ada pada banyak macam tanaman. Saponin mempunyai efek membranolitik yaitu membentuk kompleks dengan kolesterol di membran sel protozoa (P.R. Cheeke, 2000). Saponin mempunyai efek antibakteri dan antijamur yang bagus. Efek antijamur dan antibakteri terganggu dengan adanya gugus monosakarida dan turunannya. Saponin dapat berfungsi sebagai detergen. Detergen memiliki struktur yang dapat berikatan dengan molekul hidrofilik dan molekul-molekul organik non polar (lipofilik) sehingga mampu merusak membran sitoplasma dan membunuh bakteri (Cheeke, 2000).



Gambar 2.9 Struktur senyawa inti saponin (Robinson, 1995)

2.6.6 Tanin

Tanin diduga dapat mengkerutkan dinding sel atau membran sel sehingga mengganggu permeabilitas sel itu sendiri. Akibat terganggunya permeabilitas, sel tidak dapat melakukan aktivitas hidup sehingga pertumbuhannya terhambat atau bahkan mati (Ajizah, 2004). Efek antibakteri tanin antara lain melalui : reaksi dengan membran sel, inaktivasi enzim dan destruksi atau inaktivasi fungsi materi genetik. Senyawa tanin jika direaksikan dengan FeCl_3 menghasilkan senyawa kompleks berwarna hijau kehitaman atau biru tua.



Gambar 2.10 Struktur senyawa tanin (Robinson, 1995)

2.7 KLT-Bioautografi

2.7.1 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi adalah suatu nama yang diberikan untuk teknik pemisahan tertentu. Pada dasarnya semua cara kromatografi menggunakan dua fase yaitu fase diam dan fase gerak. Pemisahan-pemisahan ini bergantung pada gerakan relatif dari dua fase ini (Sastrohamidjojo, 2005). Prinsip dari pemisahan adalah adanya perbedaan sifat fisik dan kimia dari senyawa yaitu kecenderungan dari molekul untuk melarut dalam cairan (kelarutan), kecenderungan molekul untuk menguap (keatsirian), kecenderungan molekul untuk melekat pada permukaan serbuk labus

(adsorpsi, penyerapan). Salah satu cara pemisahan adalah Kromatografi Lapis Tipis.

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dapat digunakan untuk tujuan analitik dan preparatif. KLT analitik digunakan untuk menganalisa senyawa-senyawa organik dalam jumlah kecil, misalnya menentukan jumlah komponen dalam campuran dan menentukan pelarut yang tepat untuk pemisahan dengan KLT preparatif. KLT preparatif digunakan untuk memisahkan campuran senyawa dari sampel dalam jumlah besar berdasarkan fraksinya, yang selanjutnya fraksi-fraksi tersebut dikumpulkan dan digunakan untuk analisa berikutnya (Townshend, A, 1995).

Identifikasi dari senyawa-senyawa yang terpisah dari lapisan tipis menggunakan harga Rf. Harga Rf didefinisikan sebagai berikut (Sastrohamidjojo, 2005) :

$$\text{Harga Rf} = \frac{\text{Jarak yang digerakkan oleh senyawa dari titik asal}}{\text{Jarak yang digerakkan oleh pelarut dari titik asal}} \dots (2.1)$$

Harga-harga Rf untuk senyawa-senyawa murni dapat dibandingkan dengan harga-harga standart. Harga-harga Rf yang diperoleh hanya berlaku untuk campuran tertentu dari pelarut dan penyerap yang digunakan, meskipun demikian daftar dari harga-harga untuk berbagai campuran dari pelarut dan penyerap dapat diperoleh (Sastrohamidjojo, 2005).

Menurut Alam, dkk (2012) flavonoid dapat dideteksi dengan pereaksi semprot sitoborat dengan memberikan warna kuning kehijauan pada UV 366. Pereaksi semprot FeCl₃ dapat mendeteksi senyawa fenolik dengan memberikan warna hitam pada pengamatan visual. Pereaksi semprot FeCl₃ juga dapat

mendeteksi senyawa tanin dengan memberikan warna hijau atau biru kehitaman. Dragendroff digunakan untuk mendeteksi adanya senyawa alkaloid dengan memberikan warna coklat pada pengamatan visual. LB digunakan untuk mendeteksi steroid pada pengamatan UV 366 (Wagner dan Bladt, 1996), menurut Handayani, dkk (2008) steroid memberikan warna hijau pada pengamatan UV 366. Pereaksi semprot LB juga dapat mendeteksi senyawa terpenoid dengan memberikan warna merah (Farnsworth, 1996).

2.7.2 Bioautografi

Metode KLT-bioautografi merupakan metode untuk mendeteksi bercak pada kromatogram hasil kromatografi lapis tipis yang memiliki aktivitas antimikroba sehingga mendekati metode separasi dengan uji biologis (Pratiwi, 2008). KLT-bioautografi dapat dengan cepat memisahkan dan mendeteksi komponen aktif dari ekstrak tanaman, dan juga memiliki keuntungan tambahan seperti praktis, sederhana, dan tidak membutuhkan peralatan khusus (Gu dkk., 2009). Ada tiga macam metode bioautografi yaitu: bioautografi kontak, bioautografi agar-overlay, bioautografi langsung.

Pada bioautografi kontak, kromatogram hasil elusi diletakkan di atas media agar yang telah diinokulasi mikroba uji selama beberapa menit atau jam sehingga proses difusi dapat terjadi. Setelah itu kromatogram diambil dan media agar diinkubasi. Daerah hambatan ditunjukkan dengan adanya spot antimikroba yang menempel pada permukaan media agar. Dalam bioautografi imersi (agar-overlay). Kromatogram ditutupi dengan media agar cair. Setelah pemadatan, inkubasi dan pewarnaan (biasanya dengan garam tetrazolium), pita penghambatan atau pertumbuhan divisualisasikan (Nicolaus, 1961 dalam Choma 2005).

Terkadang, sebelum proses inkubasi, pelat dibiarkan selama beberapa jam pada suhu rendah untuk memungkinkan difusi. Teknik agar overlay merupakan gabungan dari bioautografi kontak dan langsung (Choma, 2005). Antimikroba ditransfer dari pelat KLT ke lapisan agar seperti dalam uji kontak tetapi selama inkubasi dan visualisasi lapisan agar tetap berada pada plate seperti dalam autografi langsung (Choma, 2005). Bioautografi langsung dilakukan dengan menyemprotkan suspensi mikroba uji pada kromatogram lalu diinkubasi. Daerah hambatan yang terbentuk dapat diketahui dengan cara menyemprot garam tetrazolium pada kromatogram. Garam tetrazolium akan diubah oleh mikroba melalui enzim dehidrogenase menjadi pewarna formazan. Spot terang pada kromatogram merupakan penanda lokasi daerah hambatan atau senyawa antimikroba, karena dengan terbunuhnya bakteri maka tidak ada enzim dehidrogenase yang mengubah tetrazolium menjadi formazan (Choma, 2005).

Salah satu keuntungan metode bioautografi dibandingkan dengan metode lain seperti difusi agar dan pengenceran adalah dapat digunakan untuk mengetahui aktivitas biologi secara langsung dari senyawa kompleks, terutama yang terkait dengan kemampuan suatu senyawa untuk menghambat pertumbuhan mikroba (Kavanagh, 1972), selain untuk pemisahan dan identifikasi kelebihan lainnya yakni, metode bioautografi tersebut cepat, mudah untuk dilakukan, murah, hanya membutuhkan peralatan sederhana dan interpretasi hasilnya relatif mudah dan akurat (Kusumaningtyas, dkk., 2008). Beberapa penelitian yang menguji aktivitas *Candida albicans* dengan metode KLT-bioautografi melaporkan beberapa senyawa aktif sebagai anti jamur berasal dari golongan senyawa yang berbeda-beda. Salni, dkk (2013) melaporkan senyawa antijamur dalam fraksi aktif n-

heksana lengkuas putih yang diuji dengan bioautografi kontak adalah golongan fenol. Purwantini dan Wahyuno (2002) melaporkan senyawa antijamur dalam ekstrak petroleum eter kulit buah delima dengan bioautografi kontak adalah golongan sterol. Marlin, dkk (2015) melaporkan senyawa antijamur dalam fraksi aktif etil asetat buah belimbing wuluh dengan bioautografi kontak adalah tanin. Mangunwardoyo, dkk (2009) melaporkan senyawa antijamur dalam ekstrak etanol herba meniran (*Phyllanthus niruri L.*) dengan bioautografi kontak adalah golongan alkaloid dan tanin. Efendi dan Hertiani (2013) melaporkan senyawa antijamur dalam ekstrak etanol *Myrmecodia tuberosa Jack* dengan bioautografi kontak adalah golongan fenolik. Kusumaningtyas, dkk (2008) melaporkan senyawa antijamur dalam ekstrak n-heksana *Alipina galanga* dengan bioautografi overlay adalah golongan terpenoid.



- A. Plat KLT ditempelkan ke media yang telah berisi biakan jamur *Candida albicans*
- B. Zona hambat yang terbentuk pada salah satu spot di Plat KLT dengan MTT

Gambar 2.11 Proses Bioautografi

BAB III

METODOLOGI

3.1 Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan April-Oktober 2016 di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia, Laboratorium Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.2 Alat dan bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang akan digunakan pada penelitian ini adalah alat-alat untuk proses ekstraksi maserasi, uji fitokimia dan uji KLT-bioautografi: baskom, loyang, toples, cawan penguap, desikator, neraca analitik, spatula, corong buchner, erlenmeyer vakum, pompa vakum, oven, batang pengaduk, kaca arloji, beaker glass, tabung reaksi, penjepit kayu, pisau, seperangkat alat *rotary evaporator vacuum*, pipet tetes, pipet ukur, erlenmeyer, bola hisap, gelas arloji.

Alat-alat untuk uji aktivitas antijamur, uji KHM dan KBM: LAF (*Laminar Air Flow*), cawan petri, erlenmeyer, kawat ose, koran/kertas, karet gelang, lampu UV, autoclave, inkubator, aluminium foil, kertas cakram, pinset, bunsen spirtus, korek api, plat silika F₂₅₄, hair dryer, tisu, spektroskopi uv-vis.

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang akan digunakan pada penelitian ini antara lain: simplisia daun *Ruellia tuberosa L* (diperoleh dari Materia Medica, Batu, Malang), biakan jamur *Candida albicans* (diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya), etanol (Merck), alkohol, SDA

(*Saboraud Dextrose Agar*) (Merck), SDB (*Saboraud Dextrose Broth*) (Merck), akuades, NaCl (Himedia), ketokanzol, DMSO (Dimethyl Sufoxide) 100%, HCl (lipi), serbuk Mg, FeCl₃ (Merck), kloroform (Merck), asam asetat anhidrat (Merck), H₂SO₄ (Lipi), asam asetat glasial (Merck), metanol (Merck), dragendroff.

3.3 Rancangan penelitian

Penelitian ini bersifat deskriptif, kualitatif dan kuantitatif. Terdiri dari 3 tahap, tahap pertama bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol daun plethekan terhadap aktivitas jamur *Candida albicans*. Tahap pertama ini daun plethekan diekstraksi maserasi selama 5 hari lalu dipekatkan dengan *rotary evaporator vacum*. Ekstrak yang dihasilkan dilanjutkan dengan uji identifikasi senyawa dengan fitokimia selanjutnya dilakukan uji aktivitas antijamur terhadap jamur *Candida albicans*. Uji tahap kedua bertujuan untuk mengetahui konsentrasi terendah ekstrak etanol daun plethekan dalam menghambat dan membunuh jamur *Candida albicans*. Pada tahap ini akan digunakan variasi konsentrasi, berikut diantaranya:

K1 : 10 mg/mL

K2 : 15 mg/mL

K3 : 20 mg/mL

K4 : 25 mg/mL

Percobaan diulang 3 kali sehingga terdapat 12 percobaan. Penelitian menggunakan metode dilusi tabung untuk menentukan KHM dan penanaman pada media SDA untuk menentukan KBM.

Penelitian tahap ketiga bertujuan untuk mengetahui golongan senyawa aktif yang memiliki aktivitas antijamur terhadap *Candida albicans*. Pada tahap kedua ini ekstrak etanol daun plethekan dilakukan uji KLT-bioautografi guna mengetahui aktivitas biologi secara langsung dari kelompok senyawa yang mampu menghambat pertumbuhan *Candida albicans*.

3.4 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan tahapan-tahapan sebagai berikut:

1. Preparasi sampel
2. Pengukuran kadar air
3. Ekstraksi sampel
4. Identifikasi golongan senyawa aktif ekstrak etanol daun plethekan dengan uji fitokimia
5. Uji aktivitas antijamur
 - 5.1 Sterilisasi alat
 - 5.2 Pembuatan media Saboraud Dextrose Agar dan Saboraud Dextrose Broth
 - 5.3 Peremajaan biakan jamur *Candida albicans*
 - 5.4 Pembuatan inokulum jamur *Candida albicans*
 - 5.5 Uji daya hambat ekstrak etanol daun plethekan terhadap *Candida albicans*
6. Uji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan uji Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ekstrak etanol daun plethekan
7. Pemisahan senyawa dengan kromatografi lapis tipis analitik
8. Uji aktivitas antijamur dengan metode bioautografi kontak
9. Analisis data

3.5 Prosedur Kerja

3.5.1 Preparasi Sampel (Materia Medica)

Tanaman plethekan terlebih dahulu disortir dan dibersihkan dari debu juga kotoran dengan dicuci. Setelah itu tanaman plethekan dikeringkan di dalam oven pada suhu 45° C selama 72 jam. Selanjutnya dihaluskan dengan blender dan diayak dengan ayakan ukuran 90 mesh sehingga diperoleh serbuk yang halus. Serbuk yang telah halus dimasukkan kedalam toples dan ditutup rapat.

3.5.2 Pengukuran Kadar Air (Hadiyati, 2011)

Analisis kadar air dilakukan pada sampel dalam keadaan serbuk. Sebelumnya, cawan dipanaskan terlebih dahulu dalam oven pada suhu 100 °C sekitar 15 menit untuk menghilangkan konsentrasinya, kemudian cawan disimpan dalam desikator selama 10 menit. Cawan tersebut selanjutnya ditimbang dan dilakukan perlakuan yang sama sampai diperoleh berat cawan yang konstan. Setelah itu, sampel kering ditimbang sebanyak 2 gram dan dimasukkan ke dalam cawan yang telah diketahui berat konstannya. Setelah itu dikeringkan dengan oven pada suhu 100-105 °C selama ± 15 menit untuk menghilangkan kadar air. Selanjutnya, sampel disimpan dalam desikator selama ± 10 menit dan ditimbang. Sampel tersebut dipanaskan kembali dalam oven ± 15 menit, lalu didinginkan dalam desikator dan ditimbang kembali. Perlakuan ini diulangi sampai berat konstan. Kadar air dihitung menggunakan rumus berikut:

$$Kadar\ air = \frac{b-c}{b-a} \times 100\% \dots\dots\dots 3.1$$

Keterangan: a = berat konstan cawan kosong
 b = berat cawan + sampel ssebelum dikeringkan
 c = berat konstan cawan + sampel setelah dikeringkan

3.5.3 Ekstraksi Maserasi (Kusumaningtyas, dkk., 2008)

Serbuk daun *Ruellia tuberosa* L masing-masing 100 gram direndam dalam 500 mL pelarut etanol dengan perbandingan pelarut 1:5 (b/v). Perendaman dilakukan selama 12 hari dengan beberapa kali pengadukan. Ekstrak tanaman plethekan yang dihasilkan disaring dengan vakum dan filtratnya dipekatkan dengan *rotary evaporator vacuum* pada suhu 55 °C dan tekanan -700 hPa. Proses pemekatan dihentikan ketika pelarut telah menguap dengan sempurna, yakni saat pelarut sudah tidak menetes lagi dari kondensor. Ekstrak pekat yang dihasilkan kemudian ditimbang dan dihitung rendemennya dengan persamaan:

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak kasar yang diperoleh}}{\text{berat sampel yang digunakan}} \times 100\% \dots\dots\dots 3.2$$

3.5.4 Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Etanol Daun Plethekan dengan Uji Fitokimia (Hayati, 2008)

Uji fitokimia merupakan uji kualitatif kandungan senyawa pada tumbuhan tingkat tinggi, sehingga dapat diketahui senyawa yang terdapat didalamnya. Senyawa kimia pertahanan tumbuhan dapat diketahui melalui uji fitokimia. Biasanya uji fitokimia ini dilakukan dalam tabung dengan jumlah sampel yang relatif sedikit, sehingga sering dikenal sebagai metode tabung.

3.5.4.1 Uji Alkaloid (Indrayani, dkk, 2006)

Ekstrak daun plethekan dimasukkan kedalam tabung reaksi kemudian ditambahkan HCl 2% sebanyak 0,5 mL. larutan dibagi menjadi dua tabung, tabung I ditambahkan 0,5 mL reagen Dragendorff sedangkan tabung II ditambahkan 2-3 tetes reagen Mayer. Jika tabung I terbentuk endapan berwarna

jingga dan pada tabung II terbentuk endapan berwarna kekuning-kuningan, menunjukkan adanya alkaloid.

3.5.4.2 Uji Tanin (Utami, 2014)

Ekstrak daun plethekan dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan dengan 2-3 tetes larutan FeCl_3 1%. Jika bahan mengandung tannin maka akan dihasilkan larutan berwarna hijau kehitaman atau biru tua.

3.5.4.3 Uji Steroid dan triterpenoid (Indrayani, dkk., 2006)

Ekstrak daun plethekan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform kemudian ditambahkan 0,5 mL asam asetat anhidrat. Ditambah 1-2 mL H_2SO_4 pekat melalui dinding tabung tersebut. Apabila terbentuk warna hijau atau biru, maka ekstrak positif mengandung steroid. Sedangkan apabila terbentuk warna ungu-merah, maka ekstrak positif mengandung triterpenoid.

3.5.4.4 Uji Flavonoid (Indrayani, dkk, 2006)

Ekstrak daun plethekan dimasukkan kedalam tabung reaksi kemudian dilarutkan dalam 1-2 mL methanol panas 50%. Ditambahkan serbuk Mg dan 0,5 mL HCl pekat. Adanya flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya larutan berwarna merah atau jingga.

3.5.4.5 Uji Saponin (Sari, 2011)

Ekstrak daun plethekan sebanyak 1 mg ditambahkan aquades 10 mL dan dikocok kuat-kuat selama 30 menit sampai muncul busa. Tabung reaksi diletakkan dalam posisi tegak selama 30 menit. Apabila masih terdapat busa, maka

kemungkinan mengandung saponin. Untuk memastikan bahwa busa yang terbentuk berasal dari saponin maka ditetaskan larutan asam sebanyak 3 tetes, bila busa stabil maka dipastikan terdapat saponin.

3.5.5 Uji Aktivitas Antijamur

3.5.5.1 Sterilisasi (Cappuccino dan Sherman, 2005)

Alat tahan panas, bahan dan medium yang akan digunakan untuk penelitian disterilisasi menggunakan *autoclav* selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm. Sebelumnya, alat-alat dicuci bersih, dikeringkan dan dibungkus dengan kertas. Alat yang tidak tahan panas disterilkan dengan menggunakan alkohol.

3.5.5.2 Pembuatan Media Saboraud Dextrose Agar (SDA) dan Media Saboraud Dxtrose Broth (SDB) (Warsinah, dkk., 2011)

Pembuatan media agar dilakukan dengan mencampur 6,5 gr SDA dengan 100 mL akuades dalam erlenmeyer 250 mL. Medium dipanaskan sampai mendidih agar tercampur dengan sempurna. Kemudian didiamkan dan disterilkan di dalam autoklaf selama 15 menit, pada suhu 121°C, tekanan 2 atm.

Pembuatan media cair dilakukan dengan cara mensuspensikan 3 gr SDB ke dalam 100 mL akuades dalam erlenmeyer 100 mL. Medium dipanaskan sampai mendidih agar tercampur dengan sempurna. Kemudian didiamkan dan disterilkan di dalam autoklaf selama 15 menit, pada suhu 121°C, tekanan 2 atm.

3.5.5.3 Peremajaan Biakan Jamur *Candida albicans* (Setyowati, dkk., 2014)

Media SDA dipanaskan di atas hotplate sampai mencair, kemudian dituang kedalam 3 buah tabung reaksi, kemudian diletakkan dalam keadaan miring dan

dibiarkan memadat. Selanjutnya koloni jamur diambil dari biakan murni yang tersedia, dilakukan secara aseptis dengan jarum ose dan digoreskan pada media agar miring lalu diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam

3.5.5.4 Pembuatan Inokulum Jamur *Candida albicans* (Fitranti, dkk., 2011)

Pembuatan inokulum jamur *Candida albicans* dilakukan dengan cara mensuspensikan 1 ose jamur *Candida albicans* hasil tahap peremajaan kedalam 25 mL media SDB. Lalu diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Lalu diukur absorbansinya dan diencerkan dengan media SDB hingga absorbansi 0,39 atau setara dengan $1,25 \cdot 10^7$ cfu/mL

3.5.5.5 Uji Daya Hambat Ekstrak Etanol Daun Plethekan terhadap Jamur *Candida albicans* (Suganda, 2003)

Uji aktivitas antijamur dilakukan dengan metode difusi agar menggunakan kertas cakram (diameter 7 mm). Dimasukkan suspensi jamur *Candida albicans* sebanyak 100 µl ke dalam cawan petri steril, kemudian dimasukkan media SDA yang masih cair sebanyak 10 mL, dan media dibiarkan memadat. Di atas medium SDA diletakkan kertas cakram steril yang telah direndam dengan ekstrak etanol daun plethekan dengan konsentrasi 0.1 g/mL (10%) selama 30 menit. Kertas cakram diletakkan di atas permukaan media menggunakan pinset dan ditekan sedikit. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kontrol positif yang digunakan adalah ketokanzol 10% dan kontrol negatif yang digunakan adalah DMSO. Setelah 24 jam diamati ada tidaknya zona bening disekitar kertas cakram. Zona bening yang terbentuk diukur diameternya dengan jangka sorong. Adanya daerah zona bening di sekeliling kertas cakram menunjukkan adanya aktivitas antijamur.

Zona hambat = diameter zona bening – diameter cakram.....3.3

3.5.5.6 Uji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Uji Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) Ekstrak Etanol Daun Plethekan (Atlas *dkk.*, 1984; Pratiwi, 2008)

Uji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dilakukan dengan metode dilusi tabung atau pengenceran yaitu dengan cara penanaman jamur pada media SDB (*Saboraud Dextrose Broth*) pada tabung reaksi. Uji Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dilakukan dengan metode dilusi agar yaitu dengan cara penanaman jamur pada media SDA (*Saboraud Dextrose Agar*) pada cawan petri.

Disiapkan 14 tabung reaksi untuk percobaan dan 2 tabung reaksi untuk kontrol. Diisi 1 tabung dengan 1 mL SDB dan 1 mL suspensi jamur *Candida albicans* pada kontrol positif, sedangkan pada kontrol negatif berisi 1 gram ekstrak daun plethekan dan 1 mL SDB. Diisi 5 tabung reaksi yang lain dengan 9 mL SDB steril dan ditambahkan 0,5 mL suspensi jamur *Candida albicans* dan 0,5 mL ekstrak etanol daun plethekan yang telah diencerkan pada DMSO 10% dengan konsentrasi 10; 15; 20; 25 mg/mL. Masing-masing konsentrasi dibuat pada 3 tabung yakni untuk tiga kali pengulangan. Diambil 3 mL secara aseptis untuk dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 600 nm. Diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam. Divortex dan diukur nilai absorbansinya kembali. KHM dihitung dengan cara:

$KHM = OD \text{ setelah diinkubasi} - OD \text{ sebelum diinkubasi}.....3.4$

Konsentrasi terendah yang dapat menghambat bakteri ditunjukkan dengan tidak adanya kekeruhan setelah diinkubasi ($OD \leq 0$). Uji KBM dilakukan dengan menumbuhkan kultur pada tabung positif KHM secara *pour plate* pada media SDA steril. Diambil 1 mL dari konsentrasi yang menunjukkan positif KHM,

ditumbuhkan pada media SDA secara *pour plate*, diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. KBM ditunjukkan dengan tidak adanya koloni jamur yang tumbuh pada media.

3.5.6 Pemisahan Senyawa dengan Kromatografi Lapis Tipis Analitik (Sutrisno, 1993)

Identifikasi dengan KLT dilakukan dengan menggunakan plat silika gel F₂₅₄ sebagai fase diamnya. Disiapkan masing-masing plat dengan ukuran 1x10 cm. Ekstrak etanol daun *Ruellia tuberosa L* konsentrasi 20.000 ppm ditotolkan pada jarak ± 1 cm dari tepi bawah plat dengan pipa kapiler, kemudian dikeringkan plat silika gel dan ditotolkan kembali ekstrak pekat dari daun *Ruellia tuberosa L* dengan menggunakan pipa kapiler. Perlakuan ini dihentikan sampai dirasa sudah cukup. Kemudian hasil penotolan dapat dielusi dengan variasi jenis pelarut sesuai dengan golongan senyawanya yang telah disiapkan didalam bejana. Setelah gerakan fase gerak sampai pada garis batas, elusi dapat dihentikan. Kemudian lempeng dikeringkan dengan diangin-anginkan dan disemprot dengan pereaksi semprot sitoborat untuk flavonoid, FeCl₃ untuk fenolik dan tanin, dragendroff untuk alkaloid, LB untuk steroid dan terpenoid. Kemudian diperiksa dibawah sinar UV pada panjang gelombang 254 dan 366. Diamati masing-masing spot dengan masing-masing warna yang terbentuk.

Identifikasi dari senyawa-senyawa yang terpisah dari lapisan tipis menggunakan harga R_f sebagai berikut (Sastrohamidjojo, 2005) :

$$\text{Harga Rf} = \frac{\text{Jarak yang digerakkan oleh senyawa dari titik asal}}{\text{Jarak yang digerakkan oleh pelarut dari titik asal}} \dots\dots\dots 3.5$$

3.5.7 Uji Aktivitas Antijamur dengan Metode Bioautografi Kontak (Kusumaningtyas, dkk., 2008)

Disiapkan cawan petri besar dan diisi dengan 100 mL SDA yang sudah diinokulasi dengan 10 μ L suspensi jamur (10^8 cfu/mL). Setelah mengering, lempeng KLT dari proses sebelumnya ditempelkan selama 1 jam pada media SDA dalam cawan petri yang sudah diinokulasi dengan jamur *Candida albicans*. Lempeng kromatogram diangkat kembali dan cawan petri diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Pengamatan dilakukan dengan melihat zona hambat yang terbentuk sebagai daerah terang yang tidak ditumbuhi jamur pada kisaran jam ke 18-24.

3.5.8 Analisis Data

Analisis data pada uji daya hambat ekstrak daun *Ruellia tuberosa L* terhadap *Candida albicans* adalah deskriptif berdasarkan zona hambat yang dihasilkan disekitar paper disk, plat KLT dan cawan pada bioautografi. Diameter zona hambat pertumbuhan jamur diukur dalam satuan mm pada paper disk dan cawan pada bioautografi, satuan cm (pada plat KLT) dan dijadikan ukuran kuantitatif untuk ukuran zona hambat.

BAB IV

PEMBAHASAN

4.1 Preparasi Sampel

Sampel basah daun plethekan dikeringkan dalam oven dengan suhu 45°C selama 72 jam. Pengeringan dengan suhu rendah dilakukan untuk menghindari perubahan kimia pada kandungan senyawa aktif daun plethekan. Pengeringan dalam oven berfungsi untuk mempercepat penghilangan air dan mendapatkan sampel dengan kadar air yang rendah, sehingga tidak mudah busuk selama penyimpanan. Sampel yang sudah kering kemudian digiling dan diayak dengan ayakan ukuran 90 mesh. Serbuk simplisia yang dihasilkan dapat dilihat pada Lampiran 6. Penggilingan dan pengayakan dilakukan guna memperluas luas permukaan sehingga sel jaringan yang mengandung senyawa yang akan diisolasi mudah diikat oleh pelarut dan senyawa tersebut dapat larut sebanyak mungkin dalam pelarut saat proses ekstraksi maserasi.

4.2 Pengukuran Kadar Air

Kadar air merupakan jumlah air yang terkandung dalam tumbuhan. Kadar air merupakan karakteristik yang sangat penting pada tumbuhan, karena air pada bahan akan mempengaruhi daya tahan terhadap serangan mikroba, tekstur dan cita rasa pada bahan. Kadar air dalam bahan juga ikut menentukan kesegaran dan daya awet bahan tersebut, kadar air yang tinggi mengakibatkan mudahnya bakteri, kapang dan khamir untuk berkembang biak sehingga akan terjadi perubahan pada bahan yang dapat mempercepat pembusukan (Winarno, 2008).

Hasil pengukuran kadar air sampel kering daun plethekan pada penelitian ini adalah sebesar 7,29%. Perhitungan kadar air dapat dilihat pada Lampiran 4.

Bila kadar air yang terkandung dalam suatu bahan/sampel organik kurang dari 10% maka kestabilan optimum bahan akan dapat tercapai dan pertumbuhan mikroba dapat dikurangi (Puspita, 2009). Dimana kadar air maksimum yang disyaratkan agar proses ekstraksi dapat berjalan lancar yaitu sebesar 11% (Rahayu, 2009). Semakin rendah nilai kadar air bahan maka akan semakin memudahkan pelarut untuk mengekstrak komponen senyawa aktif yang diinginkan (Nurmillah, 2009).

4.3 Ekstraksi Maserasi

Maserasi merupakan proses ekstraksi simplisia menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengadukan pada suhu ruang. Pada penelitian ini pelarut yang digunakan dalam proses maserasi adalah etanol 96%. Menurut Trifani (2012) etanol digunakan sebagai pelarut karena bersifat polar, universal dan mudah didapat. Selain itu etanol juga merupakan pelarut untuk zat organik maupun anorganik (Wiratmaja, 2011). Kemurnian pelarut etanol terendah yang dapat melarutkan suatu senyawa metabolit sekunder adalah 66%, sehingga etanol 96% diharapkan mampu mengekstrak senyawa metabolit sekunder lebih banyak. Karena semakin tinggi konsentrasi etanol maka akan semakin mudah dalam proses pemisahan senyawa metabolit sekunder dari sampel (Marnoto dkk, 2012).

Proses maserasi dilakukan selama 5 hari dan ekstrak yang didapatkan selanjutnya dipisahkan dengan pelarutnya menggunakan *rotary evaporator vakum* dan didapatkan ekstrak kental etanol berwarna hijau pekat sebanyak 2,89 gr dengan rendemen 2,89% (b/b). Ekstrak pekat daun plethekan yang telah dihasilkan dapat dilihat pada Lampiran 6. Nilai rendemen yang tinggi menunjukkan proses ekstraksi zat aktif berlangsung efektif (Maulida dan Guntarti,

2015). Sehingga diharapkan dengan semakin tingginya rendemen yang terbentuk maka ekstrak uji mempunyai aktivitas sebagai antijamur yang semakin tinggi pula.

4.4 Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Etanol Daun Plethekan dengan Uji Fitokimia

Identifikasi senyawa aktif metabolit sekunder ekstrak etanol daun plethekan ini menggunakan skala kualitatif dengan uji fitokimia. Analisis fitokimia dilakukan untuk menentukan ciri senyawa aktif penyebab efek racun atau efek yang bermanfaat yang ditunjukkan oleh ekstrak tumbuhan kasar bila diuji dengan sistem biologi. Secara umum dapat dikatakan bahwa metodenya sebagian besar merupakan reaksi pengujian warna dengan suatu pereaksi warna. Penelitian ini pengujiannya dilakukan dengan cara mengambil sedikit sampel dari masing-masing ekstrak kasar isolat jamur endofit dan dimasukkan dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan pereaksi sesuai dengan senyawa yang akan diidentifikasi. Uji fitokimia dilakukan terhadap golongan senyawa steroid, triterpenoid, tanin, saponin, flavonoid dan alkaloid yang tersaji pada Tabel 4.5.

Tabel 4.1 Hasil uji fitokimia ekstrak etanol daun plethekan

Uji fitokimia	Hasil	Keterangan
Steroid	-	Ungu-merah
Triterpenoid	+	Ungu-merah
Tanin (dengan FeCl ₃)	+	Hijau kehitaman
Saponin	-	Tidak berbusa
Flavonoid	+	Jingga
Alkaloid (dengan dragendroff)	-	Oranye
Alkaloid (dengan mayer)	-	Hijau kekuningan tanpa endapan

Berdasarkan Tabel 4.1 dapat diketahui bahwa senyawa aktif yang terkandung di dalam ekstrak etanol daun plethekan adalah flavonoid, tanin dan

triterpenoid. Warna- warna yang terbentuk dari hasil uji fitokimia dapat dilihat pada Lampiran 7. Terekstraknya senyawa-senyawa yang bersifat polar seperti flavonoid dan tanin (Djamal, 1990) dimungkinkan karena pelarut yang digunakan dalam ekstraksi juga bersifat polar, sehingga senyawa yang memiliki kesamaan kepolaran akan dapat terekstrak dengan mudah. Dimana hal tersebut sesuai dengan prinsip kelarutan *like dissolve like*, yaitu suatu senyawa akan terlarut pada pelarut yang mempunyai sifat yang sama (kepolaran) (Puspita, 2012). Menurut penelitian Senthilkumar, Sambath dan vasantharaj (2013) ekstrak metanol daun plethekan mengandung senyawa terpenoid, triterpenoid, tanin, alkaloid dan glikosida. Sedangkan menurut penelitian Kader, *et. al* (2012) ekstrak metanol akar plethekan mengandung senyawa flavonoid, steroid, triterpenoid dan alkaloid.

4.4.1 Uji Saponin

Uji saponin pada ekstrak etanol daun plethekan menunjukkan hasil negatif. Hal ini ditunjukkan dengan tidak adanya busa pada sampel ketika diberi aquades dan dikocok kuat. Hasil ini diperkuat dengan penelitian Senthilkumar, Sambath dan Vasantharaj (2013) dimana dalam ekstrak metanol daun plethekan negatif mengandung senyawa saponin

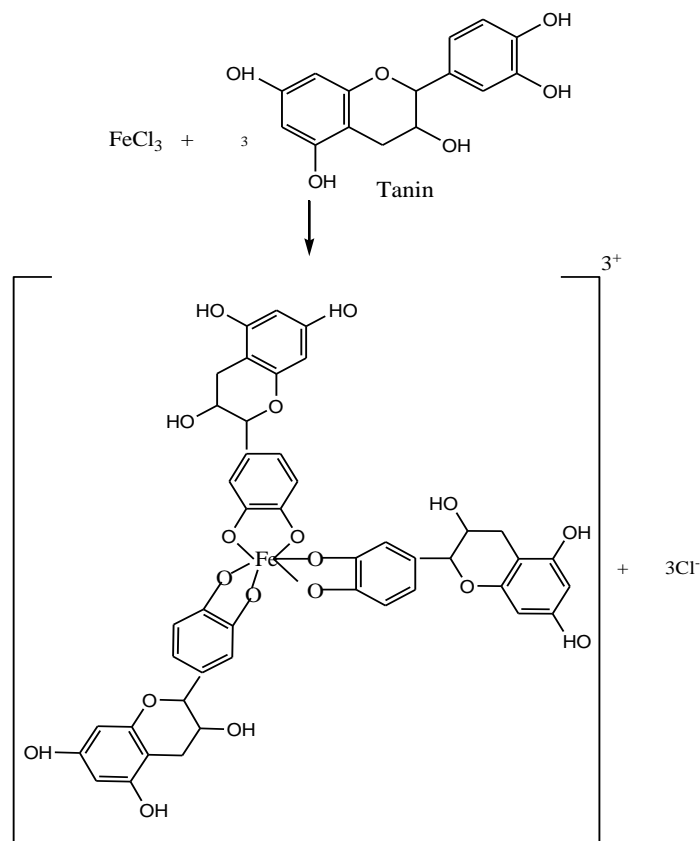
4.4.2 Uji Alkaloid

Uji alkaloid pada ekstrak etanol daun plethekan menunjukkan hasil negatif baik dengan reagen dragendroff maupun reagen mayer. Hal ini ditunjukkan dengan tidak berubahnya warna ekstrak menjadi jingga ketika diberi reagen dragendroff dan tidak adanya endapan kuning ketika diberi reagen mayer. Sedangkan menurut penelitian Senthilkumar, Sambath dan Vasantharaj (2013) ekstrak metanol daun plethekan positif mengandung senyawa alkaloid. Perbedaan

ini dimungkinkan karena adanya perbedaan kondisi tanah, cuaca dan pengaruh pestisida pada tanaman dapat mempengaruhi kandungan senyawa di dalamnya.

4.4.3 Uji Tanin

Uji fitokimia senyawa tanin dengan menambahkan ekstrak etanol daun plethekan dengan larutan FeCl_3 menunjukkan hasil positif. Perubahan warna hijau kehitaman terjadi akibat pembentukan senyawa kompleks antara tanin dengan FeCl_3 (Harborne, 1987).



Gambar 4.1 Reaksi dugaan pembentukan kompleks Fe tanin yang berwarna hijau-kehitaman (Sa'adah, 2010)

4.4.4 Uji Steroid dan Triterpenoid

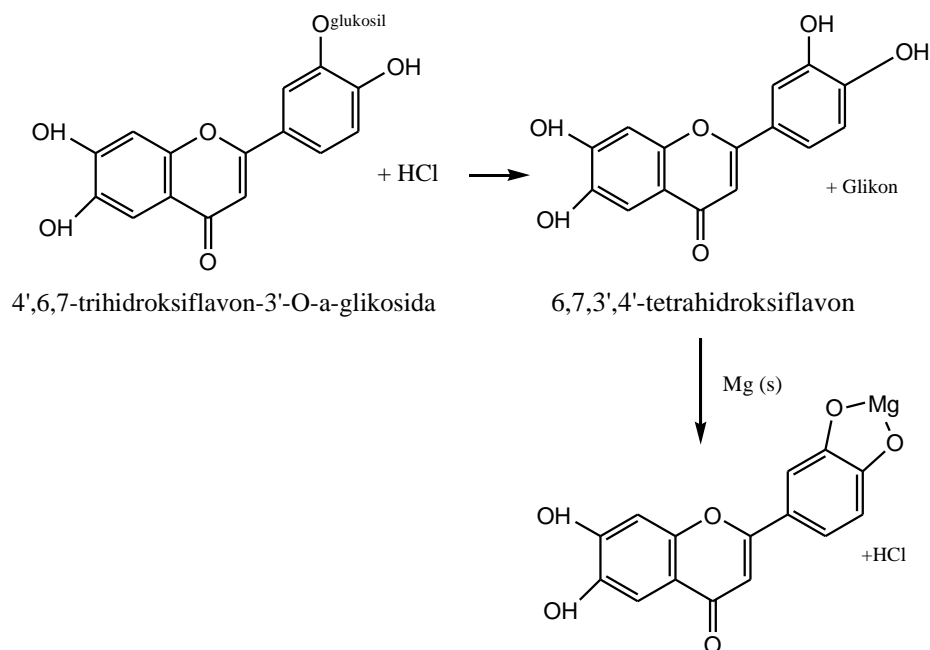
Pada uji steroid, ekstrak di tambahkan dengan 2 mL kloroform kemudian dimasukkan H_2SO_4 melalui dinding tabung reaksi melalui dinding tabung reaksi

secara hati-hati. Hasil positif bila terbentuknya warna coklat disertai dengan adanya cincin hijau steroid. Sedangkan pada terpenoid positif bila terjadi perubahan warna menjadi merah bata. Hasil yang diperoleh pada pengujian ekstrak etanol daun plethekan menunjukkan hasil positif dengan terbentuknya cincin ungu yang menunjukkan adanya kandungan triterpenoid. Senyawa triterpenoid/steroid akan mengalami dehidrasi dengan penambahan asam kuat dan membentuk garam yang memberikan sejumlah reaksi warna (Mukhlis, 2010).

4.4.5 Uji flavonoid

Uji flavonoid menunjukkan hasil positif dengan adanya perubahan warna kuning. Flavonoid termasuk dalam golongan senyawa fenol yang memiliki banyak gugus $-OH$ dengan adanya perbedaan keelektronegatifan yang tinggi, sehingga sifatnya polar. Golongan senyawa ini mudah terekstrak dalam pelarut etanol yang memiliki sifat polar karena adanya gugus hidroksil, sehingga dapat terbentuk ikatan hidrogen (Sriwahyuni, 2010).

Uji flavonoid menggunakan pereaksi wilstater dilakukan dengan menambah Mg dan HCl pekat pada sampel ekstrak etanol daun plethekan. Penambahan HCl pekat digunakan untuk menghidrolisis flavonoid menjadi aglikonnya, yaitu dengan menghidrolisis O-glikosil. Glikosil akan tergantikan oleh H^+ dari asam karena sifatnya yang elektrofilik. Reduksi dengan Mg dan HCl pekat dapat menghasilkan senyawa kompleks yang berwarna merah atau jingga pada flavonol, flavanon, flavanonol dan xanton (Robinson, 1995).

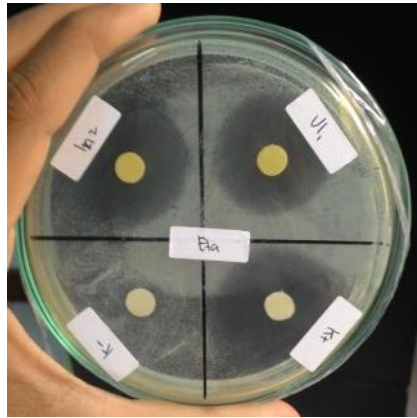


Gambar 4.2 Perkiraan reaksi antara senyawa flavonoid dengan Mg-HCl

4.5 Uji Daya Hambat Ekstrak Etanol Daun Plethekan Terhadap Jamur *Candida albicans*

Penelitian ini dilakukan untuk menguji aktivitas antijamur ekstrak etanol daun plethekan terhadap jamur *Candida albicans* secara in vitro. Ketika jamur uji diberi zat tertentu yang bersifat antijamur, maka pertumbuhannya akan terhambat. Zona hambat adalah zona bening yang terdapat di sekitar kertas cakram pada media yang sudah diinokulasi jamur *Candida albicans* atau zona yang tidak terdapat pertumbuhan *Candida albicans*. Jumlah jamur yang ditanam dalam media adalah 100 μ L dengan konsentrasi kepekatan OD 0,39 atau setara dengan $1,25 \times 10^7$ cfu/mL. Pada penelitian ini jamur *Candida albicans* akan dihambat oleh ekstrak etanol daun plethekan 10% (0,1 g/mL) dengan menggunakan kertas cakram. Karena ekstrak yang digunakan terlalu pekat dan kental yang menyebabkan ekstrak tidak mampu berdifusi kedalam media yang telah

diinokulasi jamur uji, maka ekstrak perlu dilarutkan hingga konsentrasi 10% (Senthilkumar *et al*, 2013).



Gambar 4.3 Hasil zona hambat ekstrak etanol daun plethekan terhadap *Candida albicans*

Pada penelitian ini diketahui bahwa ekstrak etanol daun plethekan mampu menghambat pertumbuhan jamur *Candida albicans* dengan kategori rata-rata hambatan yang sangat kuat yaitu 22,4 mm. Perhitungan rerata zona hambat terlampir pada Lampiran 4. Zona hambat yang terbentuk dari uji aktivitas terlampir pada Lampiran 8. Hal ini dimungkinkan karena ekstrak uji digunakan mengandung senyawa-senyawa aktif yang berperan sebagai antijamur, sehingga mampu menghambat pertumbuhan jamur uji. Dimana pada uji tahap fitokimia sebelumnya, ekstrak etanol daun plethekan positif mengandung senyawa triterpenoid, flavonoid dan tanin yang diduga memiliki sifat sebagai antijamur (Hariana, 2006 dan Padmawinata, 1995). Penelitian Senthilkumar *et al* (2013) melaporkan bahwa ekstrak daun plethekan mampu menghambat pertumbuhan jamur *Penicillium*, *Mucor*, *Tricoderma* dan *Aspergillus*. Sehingga hal ini lebih memperkuat bahwa ekstrak daun plethekan mampu bersifat sebagai antijamur (antifungal) karena telah mampu menghambat lebih dari 1 jenis jamur.

Pada kontrol (+) ketokonazol 10% menunjukkan hasil pengukuran diameter zona hambat yang paling tinggi. Hal ini dimungkinkan karena ketokonazol merupakan obat pilihan pertama untuk infeksi yang disebabkan oleh *Candida albicans*. Antibiotik ketokonazol digunakan sebagai kontrol positif terhadap jamur, aktifitas antijamurnya dengan cara menimbulkan ketidakteraturan membran sitoplasma jamur dan mempengaruhi biosintesis ergosterol dalam sel jamur (Siswandono, 1995). DMSO yang merupakan kontrol (-) tidak menunjukkan adanya daya hambat terhadap jamur *Candida albicans*. DMSO merupakan pelarut polar aprotik, tidak berwarna yang dapat melarutkan senyawa polar dan nonpolar serta tidak mempunyai aktivitas biologi. Karena penggunaan kontrol negatif bertujuan untuk memastikan bahwa diameter zona hambat ekstrak yang dihasilkan bukan pengaruh dari pelarut, tetapi murni dari senyawa aktif dalam ekstrak tersebut maka digunakan DMSO sebagai pelarut ekstrak dan kontrol negatif nya.

Menurut Hermawan, dkk (2007) bahwa interpretasi daerah hambatan pertumbuhan antimikroba mengacu pada standar umum yang dikeluarkan Departemen Kesehatan (1988) disebutkan bahwa mikroba dikatakan peka terhadap senyawa aktif yang bersifat sebagai antimikroba dari suatu tanaman apabila mempunyai ukuran diameter daya hambatan sebesar 12-24 mm. Pada penelitian Kader, *et. al* (2012) ekstrak metanol akar plethekan mampu menghambat pertumbuhan *Candida albicans* dengan diameter hambatan sebesar 18 mm. Besar atau kecilnya zona hambat yang terbentuk dari pengujian aktivitas antijamur tergantung pada tinggi atau rendahnya zat aktif yang terkandung didalam ekstrak. Sedangkan terbentuk atau tidaknya zona hambat disekitar kertas

cakram tergantung ada tidaknya senyawa aktif dalam ekstrak. Zona hambat yang besar mungkin disebabkan oleh tingginya zat aktif yang ada didalam ekstrak. Tidak terbentuknya zona hambat pada konsentrasi tertentu disebabkan oleh kecilnya konsentrasi zat aktif sehingga belum mampu menghambat mikroba. Terbentuknya zona hambat disekitar kertas cakram menunjukkan bahwa didalam ekstrak dari tumbuhan terdapat senyawa yang bersifat antimikroba (Salni, Aminasih dan Sriviona., 2013).

Jawetz *et al.*, (1996) menjelaskan bahwa mekanisme yang menyebabkan terhambatnya pertumbuhan jamur adalah kerusakan membran sel oleh zat aktif antijamur. Kerusakan membran sel akan mengganggu integritas komponen-komponen seluler dan menyebabkan proses respirasi jamur tidak terjadi. Pada akhirnya mengakibatkan tidak tercukupinya energi untuk transport aktif zat hara sehingga pertumbuhan jamur terganggu. Tinggi rendahnya aktifitas antijamur memang dapat dilihat dengan mengetahui besar kecilnya diameter zona hambat namun kekuatan aktifitas antijamur lebih ditentukan oleh nilai KHM, karena KHM menunjukkan kemampuan antimikrobia yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba dalam konsentrasi minimalnya, sedangkan penilaian berdasarkan zona hambat hanya menggambarkan kekuatan daya hambat suatu zat antijamur tanpa menggambarkan konsentrasi minimal suatu zat antijamur untuk memberikan efek antijamur (Rahayu, 2009)

4.6 Uji Konsentrasi Hambat Minimum dan Uji Konsentrasi Bunuh Minimum Ekstrak Etanol Daun Plethekan Terhadap Jamur *Candida albicans*

Pada penelitian ini penentuan KHM dan KBM dilakukan dengan menggunakan metode dilusi cair. Proses pelaksanaan uji KHM telah terlampir

pada Lampiran 9. Penentuan nilai KHM sendiri dilakukan dengan menggunakan spektrofotometri uv-vis dan harga KBM dilakukan dengan menanam hasil KHM kedalam media agar. Prinsip dilusi cair menggunakan spektrofotometri yaitu pengukuran kekeruhan kadar bertingkat substansi antijamur untuk mendapatkan KHM. Nilai kekeruhan ditunjukkan dari absorbansi atau *optical density* (OD) yang terlihat dari spektrofotometer (Maurilla, 2015). Kontrol positif yang digunakan media dan jamur uji. Sedangkan kontrol negatif yang digunakan adalah media dan ekstrak uji.

Penggunaan metode dilusi cair ini mempunyai beberapa keuntungan dibandingkan dengan metode yang lain, diantaranya dapat menjamin homogenitas yang lebih besar antara media, bahan uji dan suspensi dan jamur karena interaksi antara ketiganya dapat lebih sempurna. Disamping itu, media dan bahan uji yang digunakan lebih sedikit sehingga lebih dapat menghemat media dan bahan uji.

Penentuan Kadar Hambat Minimum (KHM) dan KBM dilakukan dengan melihat selisih absorbansi sebelum dan setelah inkubasi. Konsentrasi terendah yang mampu menghambat pertumbuhan jamur ditunjukkan dengan selisih absorbansi sesudah dan sebelum inkubasi ≤ 0 maka diperoleh KHM (Fatisa, 2013). Nilai $\Delta OD \leq 0$ menunjukkan bahwa tidak adanya pertumbuhan jamur, artinya kemampuan jamur untuk membelah diri dihambat. Nilai $\Delta OD > 0$ menunjukkan tidak terjadi proses penghambatan pertumbuhan jamur. Sedangkan dalam uji KBM tingkat keberhasilannya ditunjukkan dengan tidak adanya koloni jamur yang tumbuh. Konsentrasi terendah yang mampu membunuh jamur uji dinyatakan sebagai KBM.

Tabel 4.2 Hasil uji KHM (OD) dan KBM (pertumbuhan jamur)

Konsentrasi ekstrak (mg/mL)	Nilai rata-rata OD KHM			Nilai KBM (Tumbuh /tidak tumbuh)	Jumlah sel jamur yang tumbuh
	Sebelum inkubasi	Setelah inkubasi	ΔOD		
K (+)	0,0532	2,0563	2,0031	Tumbuh	-
K (-)	0,381	-0,0055	-0,3865	Tidak tumbuh	0
10	0,0144	1,0056	0,9912	Tumbuh	-
15	0,0145	0,6487	0,6335	Tumbuh	$4,38.10^7$
20	0,0149	0,5233	0,5084	Tumbuh	$2,93.10^7$
25	0,0161	0,5021	0,4860	Tumbuh	$2,7.10^7$

Tabel 4.2 berdasarkan Tabel tersebut dapat diamati bahwa terjadi penurunan nilai OD seiring dengan kenaikan konsentrasi ekstrak. Hal ini diduga karena adanya penghambatan terhadap pertumbuhan jamur *Candida albicans* walaupun tidak cukup signifikan yang dibuktikan dari nilai jumlah sel jamur yang tumbuh. Dalam hal ini perhitungan jumlah sel hanya dilakukan terhadap 3 konsentrasi tertinggi saja karena telah mewakili dari keseluruhan konsentrasi. Dimana terjadi penurunan jumlah sel jamur seiring dengan kenaikan konsentrasi ekstrak yang digunakan. Hal ini sesuai dengan pernyataan Pelczar dan Chan (1986) dimana semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka senyawa aktif antimikroba yang terkandung makin banyak sehingga kemampuan untuk menghambat pertumbuhan mikroba semakin tinggi pula, 1986). Nilai OD yang masih belum mencapai target ini ($\Delta OD \leq 0$) dimungkinkan karena konsentrasi ekstrak etanol daun plethekan yang digunakan masing kurang tinggi, sehingga ekstrak belum mampu menghambat pertumbuhan jamur *Candida albicans* secara optimum. Data hasil Uv-Vis dapat dilihat pada Lampiran 5.

Menurut penelitian Adila, Nurmiatudan agustien (2013) ekstrak rimpang temulawak 25% hanya mampu menghambat dan membunuh pertumbuhan bakteri

E.coli namun tidak untuk jamur *Candida albicans*. Hal tersebut dimungkinkan karena tebalnya dinding sel jamur *Candida albicans* yang tidak mampu ditembus oleh senyawa aktif dalam ekstrak rimpang temulawak (Jawetz, *et al.*, 2005). Hal ini juga dimungkinkan terjadi pada ekstrak etanol daun plethekan yang digunakan pada penelitian ini. Senyawa aktif yang terkandung didalam ekstrak belum mampu mengimbangi pertumbuhan jamur *Candida albicans* sehingga nilai KHM dan KBM masih belum ditemukan. Hal ini juga diperkuat oleh pernyataan Biswas dan Chaffin (2005) bahwa pertumbuhan jamur *Candida albicans* lebih cepat pada media cair dengan digoyang pada suhu 37°C.

4.7 Pemisahan Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Etanol Daun Plethekan dengan Kromatografi Lapis Tipis Analitik

Identifikasi senyawa aktif pada penelitian ini dilakukan untuk mendukung data uji fitokimia menggunakan kromatografi lapis tipis. Kromatografi lapis tipis merupakan metode pemisahan yang didasarkan distribusi senyawa terhadap 2 fase, yaitu fase gerak berupa eluen (kombinasi 2 atau lebih jenis pelarut) dan fase diam berupa plat silika gel F₂₅₄ ukuran 1x10 cm. Pemisahan dikatakan baik jika menghasilkan komponen senyawa berupa noda yang banyak, berbentuk bulat tidak berekor dan pemisahan nodanya jelas. Pengamatan dapat dilakukan dengan melihat pola dan warna spot yang terbentuk baik sebelum maupun setelah ditambahkan reagen semprot yang sesuai dibawah sinar lampu UV 366 nm (Ganjar dan Rohman, 2007).

4.7.1 Tanin

Pemisahan senyawa tanin yang terkandung dalam ekstrak etanol daun plethekan dilakukan dengan menggunakan 4 variasi eluen dan masing masing

diantaranya menghasilkan spot yang berbeda-beda. Reagen pendeteksi yang digunakan dalam metode ini adalah FeCl_3 dan pendeteksi fluoresensi digunakan lampu uv λ 366 nm. Adapun eluen yang terbaik dari variasi eluen adalah kloroform : asam asetat : air (3:1,5:0,5). Eluen ini mampu memisahkan senyawa target lebih baik daripada seluen yang lain, yaitu menunjukkan adanya spot yang diduga senyawa tanin.

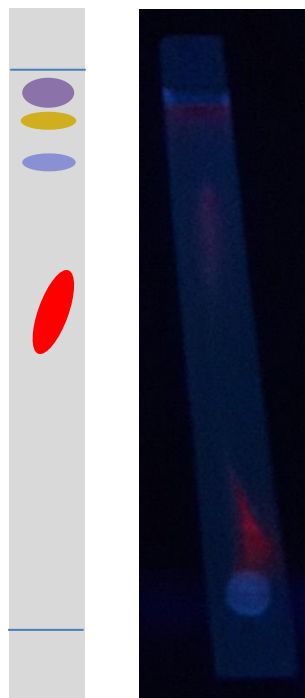
Tabel 4.3 Variasi eluen pada pemisahan senyawa tanin dan hasil pemisahannya.

No	Fase gerak (eluen)	Jumlah noda	Nilai Rf	Keterangan
1	Butanol : asam asetat : air (4:1:5)	2	0,9125; 0,7125	Terpisah baik
2	Butanol : Asam asetat : Air (2,8:0,7:1,5)	4	0,725; 0,5125; 0,4625; 0,0625	Terpisah baik
3	n-Heksan : Etil asetat (1:1)	2	0,95; 0,75	Terpisah baik
4	Kloroform : Asam asetat : Air (3:1,5:0,5)	4	0,95; 0,9125; 0,7875; 0,6125	Terpisah cukup baik

Pada uji KLT senyawa tanin ini, eluen terbaik yang mampu mengelusi senyawa tanin adalah kloroform : asam asetat : air (3:1,5:0,5). Pada Tabel 4.3 dapat dilihat bahwa eluen yang mampu memisahkan/menunjukkan banyak spot adalah eluen kloroform : asam asetat : air (3:1,5:0,5) dan Butanol : Asam asetat : Air (2,8:0,7:1,5), tapi pada eluen BAA semua spot yang terbentuk tidak ada yang menunjukkan senyawa tanin, sedangkan pada eluen KAA, senyawa tanin terbentuk pada Rf 0,95 dan 0,7875. Pada penggunaan eluen yang lain yakni Butanol : asam asetat : air (4:1:5) dan n-Heksana : Etil asetat (1:1), keduanya tidak menunjukkan senyawa tanin pada semua spot yang terbentuk.

Tabel 4.4 Hasil KLTA senyawa tanin ekstrak etanol daun plethekan dengan eluen kloroform : asam asetat : air (3:1,5:0,5)

Noda	Rf tiap noda	Warna noda di bawah sinar UV pada λ		Dugaan senyawa
		Sebelum ditambah reagen LB	Setelah ditambah reagen LB	
1	0,95	Ungu pudar	Ungu	Tanin
2	0,9125	Hijau-kuning	Oranye	-
3	0,7875	Ungu-biru	Ungu-hijau	Tanin
4	0,6125	merah	Merah	-



Gambar 4.4 Hasil KLT analitik senyawa tanin dengan eluen kloroform:asam asetat:air (3:1,5:0,5)

Berdasarkan Tabel 4.10 pemisahan senyawa dengan eluen kloroform : asam asetat : air (3:1,5:0,5) menghasilkan noda setelah penambahan reagen semprot FeCl_3 pada pengamatan lampu UV λ 366 nm diantaranya ungu, oranye, ungu-hijau, merah. Menurut Harborne (1987) tanin dapat dideteksi dengan sinar UV pendek akan terlihat noda yang berwarna lembayung (ungu). Berdasarkan hasil pemisahan ekstrak etanol daun plethekan ini, noda pertama dan ketiga tampak berwarna ungu dibawah sinar UV λ 366 nm diduga merupakan senyawa tanin.

4.7.2 Flavonoid

Pemisahan senyawa flavonoid yang terkandung dalam ekstrak etanol daun plethekan dilakukan dengan menggunakan 3 variasi eluen dan masing masing diantaranya menghasilkan spot yang berbeda-beda. Beberapa variasi eluen ini dilakukan guna memperoleh hasil pemisahan yang paling baik, yaitu noda / spot yang terbentuk tidak tumpang tindih dan tidak berekor (bulat). Reagen pendeteksi yang digunakan dalam metode ini adalah uap amoniak (NH_3) dan pendeteksi fluoresensi digunakan lampu uv λ 366 nm.

Tabel 4.5 Variasi eluen pada pemisahan senyawa flavonoid dan hasil pemisahannya.

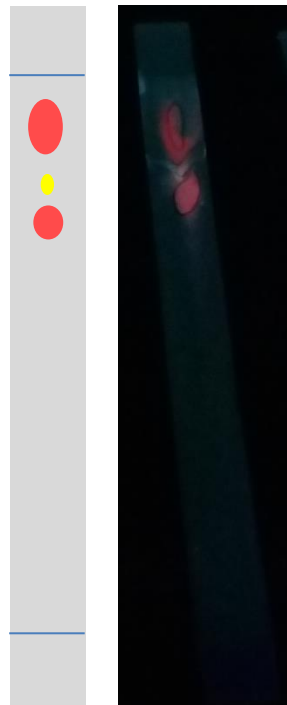
No	Fase gerak (eluen)	Jumlah noda	Nilai Rf	Keterangan
1	Etil asetat : metanol (9:1)	2	0,9625; 0,725	Terpisah baik
2	Kloroform : metanol (9:1)	1	0,975	Terpisah kurang baik
3	Butanol : asam asetat : air (4:1:5)	3	0,8875; 0,7875; 0,725	Terpisah baik

Eluen terbaik pada metode ini adalah eluen ke-3 yaitu campuran butanol : asam asetat : air (4:1:5), eluen campuran ini bersifat sangat polar, hal ini dapat diketahui karena air yang bersifat sangat polar yang mendominasi kepolaran campuran eluen ini sedangkan komposisi eluen lainnya memiliki tingkat kepolaran yang cukup rendah (bersifat kurang polar). Berdasarkan literatur, senyawa flavonoid merupakan senyawa yang bersifat polar karena mengandung gugus hidroksil yang tidak berikatan atau gugus gula (dengan ikatan glikosida), sehingga flavonoid akan cenderung larut pada pelarut yang bersifat polar (Markham, 1988). Golongan senyawa flavonoid hasil KLT setelah diberi reagen

berupa uap amoniak hijau, merah (Pradana, 2014), merah-jingga, merah lembayung (Sitorus dkk, 2012), kuning, biru muda, dan coklat (Harborne, 1987)

Tabel 4.6 Hasil KLTA senyawa flavonoid ekstrak etanol daun plethekan dengan eluen butanol : asam asetat : air (4:1:5)

Noda	Rf tiap noda	Warna noda di bawah sinar UV pada λ		Dugaan senyawa
		Sebelum ditambah reagen LB	Setelah ditambah reagen LB	
1	0,8875	Merah	Merah pudar	-
2	0,7875	Kuning	Kuning	Flavonoid
3	0,725	Merah	Merah pudar	-



Gambar 4.5 Hasil KLTA senyawa flavonoid dengan butanol:asam asetat:air (4:1:5)

Berdasarkan hasil pemisahan senyawa pada Tabel 4.12 diperoleh 2 noda/spot. Senyawa yang memiliki Rf kecil cenderung bersifat non polar yaitu cenderung tertahan pada fase diam (plat silika), sedangkan senyawa yang memiliki Rf besar cenderung bersifat polar, yaitu mengikuti elusi fase gerak (eluen) yang bersifat polar juga. Menurut Harborne (1987) pada suatu

kromatogram BAA terlihat pemisahan yang lebih jelas antara O-glikosida dan C-glikosida flavon yang tak terhidrolisis (Rf pertengahan sampai rendah) dan aglikon (Rf tinggi), adapun warna yang diperkirakan adalah coklat pudar, kuning terang dan kuning-hijau. Dengan demikian, diduga bahwa ekstrak etanol daun pletheakan mengandung flavonoid.

Menurut penelitian Shine (2014) yang melakukan KLTA ekstrak etanol umbi binahong terhadap senyawa flavonoid dengan eluen butanol:asam asetat: air (4:1:5) terbentuk 5 spot dan 3 diantaranya positif diduga senyawa flavonoid. Akan tetapi 3 spot yang positif tersebut memiliki Rf dan warna spot yang berbeda dengan penelitian ini, hal ini dimungkinkan karena bagian dan jenis tanaman yang digunakan diantara keduanya berbeda yang menyebabkan jenis senyawa flavonoid yang terkandung juga berbeda, sehingga kemungkinan untuk memiliki Rf dan warna yang berbeda sangat mungkin.

4.7.3 Triterpenoid

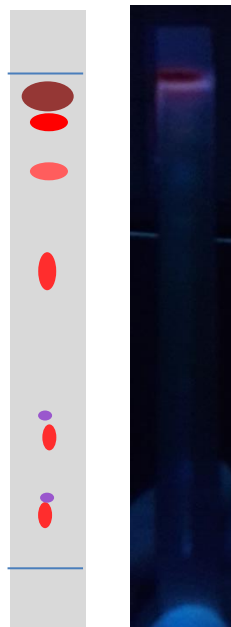
Pemisahan senyawa triterpenoid yang terkandung dalam ekstrak etanol daun pletheakan dilakukan dengan menggunakan 2 variasi eluen. Reagen pendeteksi yang digunakan dalam metode ini adalah Liberman-Burchard dan pendeteksi fluoresensi digunakan lampu uv λ 366 nm.

Tabel 4.7 Variasi eluen pada pemisahan senyawa triterpenoid dan hasil pemisahannya.

No	Fase gerak (eluen)	Jumlah noda	Nilai Rf	Keterangan
1	Etil asetat : n-Heksan (1:1)	9	0,975; 0,925; 0,875; 0,8; 0,4375; 0,15; 0,125; 0,075; 0,0625	Terpisah baik
2	Etil asetat : Kloroform (1:1)	6	0,95; 0,8625; 0,8375; 0,7875; 0,7375; 0,5375	Terpisah cukup baik

Tabel 4.8 Hasil KLTA senyawa triterpenoid ekstrak etanol daun plethekan dengan eluen etil asetat : n-Heksan (1:1)

Noda	Rf tiap noda	Warna noda di bawah sinar UV pada λ		Dugaan senyawa
		Sebelum ditambah reagen LB	Setelah ditambah reagen LB	
1	0,975	Merah cerah	Merah-ungu	Triterpenoid
2	0,925	Merah cerah	Merah-ungu	Triterpenoid
3	0,875	Merah cerah	Merah	Triterpenoid
4	0,8	Merah cerah	Jingga	Triterpenoid
5	0,4375	Merah	-	-
6	0,15	-	Ungu	Triterpenoid
7	0,125	Merah	Merah	Triterpenoid
8	0,075	-	Ungu	Triterpenoid
9	0,0625	Merah	Merah	Triterpenoid



Gambar 4.6 Hasil KLT analitik senyawa triterpenoid dengan eluen n-heksan:etil asetat (1:1)

Berdasarkan Tabel 4.7 dapat diketahui bahwa eluen yang mampu memisahkan senyawa triterpenoid adalah eluen etil asetat : n-Heksan (1:1), karena spot yang terbentuk tidak berekor dan spot yang terbentuk diduga senyawa triterpenoid semua. Apabila dibandingkan komposisinya eluen ke-1 memiliki tingkat kepolaran yang rendah (lebih non polar) dibandingkan dengan eluen ke-2

yang memiliki kepolaran lebih tinggi (lebih polar). Sedangkan senyawa triterpenoid cenderung bersifat non polar. Kemiripan kepolaran senyawa triterpenoid dalam sampel dengan eluen ke-1 menyebabkan senyawa triterpenoid cenderung mengikuti aliran fase gerak (eluen).

Hasil pemisahan senyawa pada Tabel 4.8 diperoleh 5 noda/spot. Senyawa yang memiliki Rf kecil cenderung bersifat polar yaitu cenderung tertahan pada fase diam (plat silika), sedangkan senyawa yang memiliki Rf besar cenderung bersifat non polar, yaitu mengikuti elusi fase gerak (eluen). Golongan senyawa triterpenoid hasil KLT setelah diberi reagen semprot Liberman-Burchard akan menghasilkan warna ungu (Fitriyanti dkk, 2011 dan Asih dkk, 2010), merah ungu, ungu tua (Hayati dkk, 2012 dan Bawa, 2009) merah jingga (Yusuf, 2010).

Menurut Nasliyana (2013) timbulnya warna pada noda disebabkan karena adanya interaksi antara gugus fungsional kromofor yang terikat pada gugus auksokrom dengan sinar uv. Noda yang tidak tampak pada λ 254 disebabkan karena pada λ 254 hanya berinteraksi dengan golongan khas dari aromatik, α dan β karbonil tak jenuh dan sistem terkonjugasi (Zahro, 2011), sedangkan senyawa triterpenoid bukan merupakan hidrokarbon aromatik dan bukan merupakan sistem terkonjugasi.

Berdasarkan penelitian Helda (2015) yang melakukan KLTA daun benalu mangga terhadap senyawa triterpenoid dengan eluen terbaik berupa etil asetat:n-heksan (1:1) terbentuk spot yang cukup banyak yaitu 15 spot. Beberapa spot yang positif diduga triterpenoid memiliki Rf yang sama dengan penelitian ini, yaitu pada Rf 0,912; 0,837 dan 0,775. Akan tetapi kemiripan Rf ini tidak diimbangi dengan kemiripan warna spot yang terbentuk, hal ini dimungkinkan karena jenis

senyawa spesifik yang terkandung pada masing-masing tanaman berbeda, sehingga menyebabkan adanya perbedaan warna spot diantara keduanya.

4.8 Uji Aktivitas Antijamur dengan Metode Bioautografi Kontak

Hasil pemisahan senyawa dengan KLT kemudian diuji bioautografi untuk mengetahui kemampuan aktivitas senyawa yang telah terpisah melalui KLT dalam menghambat pertumbuhan jamur uji. Bioautografi yang digunakan dalam penelitian ini merupakan bioautografi kontak, yaitu dengan meletakkan plat KLT hasil elusi senyawa akan yang akan diuji di atas media agar padat yang sudah diinokulasi dengan suspensi jamur uji. Pengamatan zona hambat yang terbentuk dilakukan antara pada jam ke 18-24. Hal ini dilakukan karena pertumbuhan jamur yang cepat dikhawatirkan belum mampu diimbangi oleh senyawa aktif antijamur yang telah terdistribusi didalam media. Sehingga zona hambat yang terbentuk harus segera diamati sebelum senyawa aktif tidak mampu lagi menghambat pertumbuhan jamur.

Pada pelaksanaan terkadang ada beberapa gelembung udara yang terjebak antara lempeng KLT dengan permukaan media agar, keadaan ini dapat menghambat proses kontak dan menimbulkan kesulitan dalam pengamatan zona jernih yang terbentuk. Untuk mencegah hal ini lempeng KLT diletakkan secara perlahan dimulai dari pangkal ke ujung lempeng KLT dan diusahakan tidak merusak media agar. Lempeng KLT kemudian ditekan perlahan agar benar-benar bersentuhan dengan media. Lempeng KLT dibiarkan 1 jam diatas media untuk memberi kesempatan komponen kimia berdifusi masuk kedalam media, setelah itu lempeng KLT diangkat (Hamburgerdan Cordel, 1987)

Senyawa antijamur ditandai dengan adanya daerah jernih yang tidak ditumbuhi jamur (Kusumaningtyas *et al.*, 2008). Menurut Yulianty *et al.* (2010) adanya aktifitas antijamur ditandai dengan terbentuknya zona hambatan yang bersifat radikal atau iradikal. Zona radikal tampak berupa daerah yang jernih tanpa terlihat pertumbuhan mikroba uji, sedangkan zona iradikal masih ada pertumbuhan mikroba tetapi dihambat atau pertumbuhan itu lebih kecil dibanding pertumbuhan yang tidak dihambat, oleh karena itu zona iradikal berupa zona yang keruh tetapi masih lebih jernih dibandingkan pertumbuhan disekitarnya.



Gambar 4.7 Hasil bioautografi golongan triterpenoid dan perbandingannya dengan hasil KLT

Hasil pada penelitian ini menunjukkan bahwa senyawa triterpenoid mampu memberikan zona hambat pada Rf 0,975 dan Rf 0,925 sedangkan pada senyawa tanin dan flavonoid belum menunjukkan aktivitas hambatan dari senyawa tersebut terhadap jamur uji. Hasil uji bioautografi telah terlampir pada Lampiran 10. Saat pengujian bioautografi terhadap senyawa tanin dan flavonoid berlangsung zona hambat yang terbentuk mengikuti bentuk plat yang telah ditempel. Hal ini dapat terjadi karena dimungkinkan eluen yang digunakan memberikan pengaruh tersendiri terhadap jamur uji, sehingga sisa eluen yang masih tersisa di plat terdistribusi kedalam media dan memberikan aktivitas

hambatan terhadap jamur uji. Valgas, dkk (2007) menyatakan bahwa fase gerak yang terlalu asam/basa dapat mempengaruhi hasil uji. Hal ini menjelaskan kesulitan menghilangkan pengaruh fase gerak pada penelitian ini terutama terhadap *Candida albicans*.

Beberapa penelitian yang menguji aktivitas *Candida albicans* dengan metode KLT-bioautografi melaporkan beberapa senyawa aktif sebagai anti jamur berasal dari golongan senyawa yang berbeda. Efendi dan Hertiani (2013) melaporkan senyawa yang memiliki aktivitas antijamur dari ekstrak etanol sarang semut adalah senyawa fenol. Mangunwardoyo, dkk (2009) melaporkan senyawa yang memiliki aktivitas antijamur dari ekstrak etanol herba meniran adalah alkaloid dan tanin. Menurut penelitian Raharjo, dkk (2012) senyawa yang memiliki aktivitas antijamur dari ekstrak etanol daun kelor adalah flavonoid dan saponin. Penelitian Kusumaningtyas, Sukmawati dan Astuti (2008) senyawa yang memiliki aktivitas antijamur dari ekstrak n-heksana rimpang *Alipina galanga* adalah senyawa terpenoid.

Berdasarkan spot-spot yang terbentuk pada hasil KLT terdapat 8 spot yang positif sebagai senyawa triterpenoid namun yang memiliki zona hambatan terhadap *Candida albicans* hanya 2 spot, hal ini dikarekan senyawa triterpenoid yang terelusi diduga berasal dari senyawa spesifik yang berbeda. Senyawa aktif yang berbeda juga memiliki aktivitas hambatan yang berbeda pula. Triterpenoid memiliki aktivitas antijamur dengan cara mempengaruhi permeabilitas membran sel yang akhirnya dapat menyebabkan membran sel lisis (Liu dan nes, 2009). Tanin bekerja dengan caramengendapkan protein dan dapat merusak sel sehingga pertumbuhan jamur terhambat (Utami, S.C., 2007). Flavonoid dapat bertindak

sebagai antijamur dengan mendenaturasi protein dan dapat merusak membran sel yang bersifat irreversible (tidak dapat diperbaiki lagi) (pelczar dan Chan, 1988). Ada beberapa kemungkinan yang dapat terjadi dan perlu mendapat perhatian pada penelitian yang akan datang. Konsentrasi senyawa khamir yang rendah tidak mampu menghambat pertumbuhan *Candida albicans*. Sebagai contoh, tanin dapat menghambat pertumbuhan kapang dan khamir apabila dalam konsentrasi tinggi. Kemungkinan lain *Candida albicans* yang diuji tahan terhadap senyawa-senyawa tersebut

4.9 Pemanfaatan Daun Plethekan sebagai Obat dalam Perspektif Islam

Berdasarkan hasil penelitian ini, ekstrak etanol daun plethekan mampu menunjukkan aktivitas sebagai antijamur terhadap *Candida albicans*. Hasil ini pun mampu mengingatkan kita akan kekuasaan Allah yang begitu besar, bahwa segala sesuatu yang Allah ciptakan tidak ada yang sia-sia. Sebagaimana firman Allah dalam surat Ali imran ayat 190-191:

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَأَخْتِلَافِ اللَّيْلِ وَالنَّهَارِ لَآيَاتٍ لِّأُولِي الْأَلْبَابِ ﴿١٩٠﴾ الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَمًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَطْلًا سُبْحَانَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ ﴿١٩١﴾

*Artinya: "Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, dan silih bergantinya malam dan siang terdapat tanda-tanda bagi orang-orang yang berakal".
" (yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri atau duduk atau dalam keadan berbaring dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata): "Ya Tuhan Kami, Tiadalah Engkau menciptakan ini dengan sia-sia, Maha suci Engkau, Maka peliharalah Kami dari siksa neraka".*

Berdasarkan arti surat Ali Imran ayat 190-191, terdapat pelajaran yang sangat berguna bagi manusia yaitu Allah menciptakan langit dan bumi dengan

berbagai tanda-tanda kekuasaan yang ada di dalamnya. Allah menumbuhkan banyak jenis tumbuh-tumbuhan dan setiap tumbuhan yang diciptakan Allah mempunyai bentuk, rasa dan manfaat yang berbeda. Satu unsur tumbuh-tumbuhan berbeda dengan unsur tumbuhan lain dengan penyerapan makanan dari akar-akar yang menembus tanah dan naik ke batang, dahan, daun dan bunga. Demikian pula Allah menciptakan tanaman plethekan yang mudah untuk diambil dan dimanfaatkan oleh manusia karena tumbuh subur secara liar maupun dibudidayakan hampir diseluruh wilayah Indonesia.

Begitu rincinya Allah mengatur apa yang ada di alam ini. Seperti halnya dengan rincinya senyawa-senyawa aktif yang terkandung dalam tanaman plethekan yang diduga memiliki peran aktif dalam menghambat pertumbuhan jamur *Candida albicans*. Hasil penelitian ini pun didapatkan bahwa daun plethekan mampu menghambat pertumbuhan jamur *Candida albicans*. Dimana senyawa yang berperan aktif tersebut adalah golongan triterpenoid. Senyawa antijamur inilah yang apabila dipelajari lebih dalam akan menjadi sumber pengobatan baru.

Berdasarkan penjelasan tersebut ada keterkaitan antara apa yang sudah tertulis dalam al-Qur'an dengan sains. Melalui makna tersiratnya Allah telah memberikan tanda-tanda kekuasaan-Nya yang ada di alam ini. Al-Qur'an merupakan petunjuk bagi tiap umat islam yang meyakini. Sebagai sumber dari segala ilmu pengetahuan, Al-qur'an tidak menyebutkan setiap hal yang ada di dunia ini secara mendetail, namun semua hal itu terkandung di dalam arti global yang disebutkan oleh al-Qur'an dan hal ini sudah dijamin oleh Allah di dalam Al-Qur'an itu sendiri.

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

1. Uji aktivitas yang dilakukan dengan menggunakan metode difusi cakram menunjukkan hasil yang baik, dimana ekstrak etanol daun plethekan mampu menghambat pertumbuhan jamur *Candida labicans* dengan kategori kuat yakni 22,4 mm.
2. Pengujian KHM dengan konsentrasi 10-25 mg/ml belum mampu menunjukkan titik optimum penghambatan terhadap *Candida albicans*. Pada uji KBM yang dilakukan guna memperkuat data hasil uji KHM juga tidak menunjukkan hasil yang baik, jamur *Candida albicans* masih tumbuh pada media agar.
3. Golongan senyawa aktif yang diduga memberikan aktivitas penghambatan terhadap jamur uji adalah senyawa triterpenoid pada Rf 0,9625 dan Rf 0,925

5.2 Saran

1. Menyaring ekstrak pekat daun plethekan yang telah dihasilkan dengan penyaring mikroba guna menghindari kontaminasi dari mikroba lain.
2. Meningkatkan konsentrasi ekstrak daun plethekan yang digunakan pada uji KHM dan KBM.

Daftar Pustaka

- Achmad, S. 1986. *Kimia Organik Bahan Alam*. Jakarta : Universitas Terbuka
- Adila, R., Nurmiati dan Anthoni A., 2013, *Uji Antimikroba curcuma spp. Terhadap Pertumbuhan Candida Albicans, Staphylococcus aureus dan Escherichia coli*.
- Ahmad, M.M. 2006. Anti Inflammatory Activities of Nigella sativa Linn (Kalongi, black seed). (Online). (<http://lailanurhayati.multiply.com/journal>). Diakses 27 Mei 2016.
- Ajizah A. 2004. Sensitivitas *Salmonella typhimurium* terhadap Ekstrak Daun *Psidium Guajava* L. Bioscientiae. 1(1): 31-8
- Aktsar, R.A., Mun'im, A., dan Elya, B. 2012. Study of Antioxidant Activity with Reduction of DPPH Radical and Xanthine Oxidase Inhibitor of the Extract of *Ruellia tuberosa* L. Leaf. International Research Journal of Pharmacy. Jakarta: Faculty of Pharmacy, Universitas of Indonesia.
- Alam, G., Mufidah, Massi, N., RT, F.M., Rahim, A dan Usmar., 2012, Skrining Komponen Kimia Dan Uji Aktivitas Mukolitik Ekstrak Rimpang Bangle (*Zingiber Purpureum* Roxb) Terhadap Mukosa Usus Sapi Secara *In Vitro*, *Majalah Farmasi dan Farmakologi*, 16(3), 123-126
- Amelia. 2015. Diakses dari <http://resepamelia.blogspot.co.id/2015/04/obat-diabetes-tanaman-pletakan-atau.html> pada 23 Februari 2016.
- Anonimous. 1993. *Penapisan Farmakologi*. Pengujian Fitokimia dan Pengujian Klinik. Yayasan Pengembangan Bahan Alam Phyto Medica.
- Ansel, H.C., dan Popovich, N.G., L.V., 1995. *Pharmaceutical Dosage Form and Drug Delivery System*. 6 th end., Malvern: Williams & Wilkins, p. 60-65
- Arirudran, B., Saraswathy, A dan Krisnamurthy, V. 2011. Pharmacognostic and Preliminary Phytochemical Studies on *Ruellia tuberosa* L. (Whole Plant). *Pharmacognosy Journal* Vol. 3. India: Department of Biochemistry, Bharadhi Women's College University of Madras, Chennai, India.
- Arun S, Giridharan P, Suthar A, Kulkarni-Almeida A, Naik V, Velmurugan R, Ram V, et. al., 2008. Isolation of Tylocrebrine from *Ruellia tuberosa* through bioassay directed column chromatography and elucidating its anti-cancer and anti-inflammatory potential. Book of Abstracts, 7th Joint Meeting of GA, AFERP, ASP, PSI & SIF, Athens, Greece p.25.
- Arundhina, E. 2014. Aktivitas Ekstrak Etanol Daun Alamanda (*Allamanda cathatica*) sebagai Antijamur terhadap *Candida albicans* dan *Pityosporum ovale* secara In Vitro. *Journal Teknobiologi*. Halaman 1-15.

- Asih, I.A.R.A. 2010. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Isoflavon dari Kacang Kedelai (*Glycine max*). *Jurnal Kimia*, vol.3, No.1:33-44
- Atlas, M.A., Brown, A.E., Dobra, K.W., Miller, L., 1984. *Experimental Microbiology Fundamentals and 60 Jurnal Ilmiah Kefarmasian*, Vol. 1, No. 2, 2011 : 51 – 62 Applications, Macmillan Publ. Co., New York. p. 267
- Atmoko, T dan A, Ma'ruf. 2009. Uji Toksisitas Dan Skrining Fitokimia Ekstrak Tumbuhan Sumber Pakan Orang Utan Terhadap Larva *Artemia salina* Leach. *Jurnal penelitian Hutan Dan Konservasi Alam VI* (1): 39.
- Bahry B dan Setiabudy R. Obat jamur, dalam farmakologi dan terapi FKUI, Ed ke-5. Jakarta: Badan Penerbit FKUI; 2011
- Bawa, I.G.A.G. 2009. Isolasi dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif dari Daging Buah Pare (*Momordica charantia L.*). *Jurnal Kimia*. Vol.3 No.2 117-124
- Bindusari, A. dan Suyoso, S., 2001, Terapi Kandidiasis Vulvovaginalis, 147-155, Berkala ilmu penyakit kulit & kelamin Fakultas Kedokteran Unair, Surabaya
- Bram, D. 2014. *Politik Hukum Pengelolaan Lingkungan Hidup*. Malang: Setara Press.
- Brooks, G.F, Butel, J.S, dan Morse SA. 2005. *Mikrobiologi kedokteran*. Alih Bahasa. Mudihardi E, Kuntaman, Wasito EB et al. Jakarta: Salemba Medika, 2005: 317-27
- Cappuccino, J. G. Dan Sherman, N. 2011. *Microbiology a Laboratory Manual 9th Edition*. Pearson Benjamin Cummings, Sans Fransisco. Halaman 23-24
- Cheeke P. R. 2000. Actual and potential applications of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* saponins in human and animal nutrition. *Proceeding of the American Society of Animal Science*. American Society of Animal Science.
- Choma, I. 2005. The Use of Thin-Layer Chromatography with direct Bioautography for Antimicrobial Analysis. *LCGC Europe*, vol 18, Issue 2. Diakses pada tanggal 10 maret 2016 pada <http://www.chromatographyonline.com>
- Cintari, L. 2009. Swamedikasi Diabetes Melitus (DM) dengan Daun ceplikan (*Ruellia tuberosa L.*). *jurnal Skala Husada Volume 6 No. 1 2009*: 65-74
- Cowan, M.M. (1999). *Plant Product as Antimicrobial Agents*. Oxford. Hal. 331. Miami University.

- Darwis. D. 2000. Teknik Dasar Laboratorium Dalam Penelitian Senyawa bahan Alam Hayati. Workshop Pengembangan Sumber Daya Manusia Dalam Bidang Kimia Organik Bahan Alam Hayati. Padang: FMIPA Universitas Andalas.
- Ditjen POM. 2009. *Materia Medika Indonesia*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI.
- Djamal R. 1990. *Rpinsip-prinsip Dasar Bekerja dalam Kimia Bahan Alam*. Padang.: Universitas Andalas.
- Dumilah, S. S. 1992. *Candida dan Kandidiasis pada Manusia*. FKUI. Jakarta
- Efendi, Y. N. dan Hertiani, T., 2013, Antimicrobial potency of ant-plant extract (*Myrmecodia tuberosa* Jack.) against *Candida albicans*, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus*, Trad. Med. J., 18 (1),53-58.
- Eschenbach., Eckert, L.O., Thwin, S.S., Hillier, L.S., dan Kiviat, N.B. 2004, The antimicrobial treatment of subacute endometritis: Aproof of concept study, American Journal of Obstetrics and Gynecology 190: 305-13.
- Farnsworth, N.R. 1996. "Biological and Phytochemical Screnning of Plants". J. Pharm 55(3), 226-227.
- Fatisa, Y dan Endah. 2013. Skrining Fitokimia dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kulit dan Biji Buah Pulasan (*Nephehium mutabile*). ISBN 978-602-7902-34-3. Prosiding Seminar Nasional IAIN Sultan Thaha Saifuddin, Jambi.
- Fitranti, A., Sutjiati, R., dan Joelijanto, R. 2011. Perbedaan Potensi Pasta Gigi dan Obat Kumur yang Mengandung Fluor terhadap Jumlah Koloni *Candida albicans* pada Piranti Ortodonsi lepasan. *Artikel Penelitian J. Kedokteran Meditek*. Vol 17 No. 45 Hal 21-28. Universitas Jember. Jember
- Gandjar, G.H., dan Rohman, A., (2007). *Kimia Farmasi Analisis*. Pustaka Pelajar: Yogyakarta: hal.120, 164, 166.
- Gandjar, Indrawati, Wellyzar Sjamsuridzal dan Ariyanti Oetari, 2006. *Mikologi Dasar dan Terapan*. Yayasan Obor Indonesia Jakarta.
- Ganiswara, 1995. *Farmakologi dan Terapan*. Edisi IV. Bagian Farmakologi. Fakultas Kedokteran. Universitas Indonesia. Jakarta.
- Gu, L., WU, T., and Wang, Z., 2009, TLC Bioautography-guided Isolation of Antioxidants from Fruit of *Perilla Frutecens* Var. *Acuta*, Food Science and Technology, 42, 131-136.
- Gupta C, Garg Ap. dan Gupta S. 2010. Antimicrobial and Phytochemical Studies of Fresh Ripe Pulp and Dried Unrip Pulp og *Mangifera indica* (AMCHUR). *Middle East Journal of Scientific Research*. 5(2): hal 75-80

- Hamburger, M.O., dan Cordell, G.A. 1987. Direct Bioautographic TLC Assay for Compounds Possesing Antibacterial Activity. *Natural Product*. 50(1):19-22.
- Handayani, D., Sayuti, N., dan Dachriyanus, 2008, Isolasi Dan Karakterisasi Senyawa Antibakteri Epidioksi Stera Dari Spon Laut *Petriosia nigrans* Asal Sumatra Barat, *Prosiding Seminar Nasional Sains dan Teknologi-II*, Lampung, Universitas Lampung.
- Harbone, J. B. 1987. *Metode Fitokimia penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Bandung: Penerbit ITB.
- Harbone, J. B. 2004. *Metode Fitokimia penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Bandung: Penerbit ITB.
- Hargono, D., 2000, *Obat Analgetik dan Antiinflamasi, Cermin Dunia Kedokteran*, Jakarta, 37-38
- Hariana, A. 2006. *Tumbuhan Obat dan Khasiatnya*, Seri 3. Penebar Swadaya. Jakarta
- Hayati, E.K. 2008. Diktat Petunjuk Praktikum “Kimia Farmasi dan Medisinal”. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Hayati, E.K., Jannah, A. dan Ningsih, R. 2012. Identifikasi Senyawa dan Aktivitas Antimalaria *In Vivo* Ekstrak Etil Asetat Tanaman Anting-Anting (*Acalypha indica L.*). *jurnal kimia*, 7 (1): 20 – 32.
- Hermawan,A., Hana, W. dan Wiwiek, T. 2007. Pengaruh Ekstrak Daun Sirih (*Piper betle L*) Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dengan Metode Diffusi Disk. Surabaya : Unair.
- Indraswari, (2008), *Optimasi Pembuatan Ekstrak Daun Dewandaru (Eugenia uniflora) Menggunakan Metode Maserasi Dengan Parameter Kadar Total Senyawa Fenolik dan Flavonoid*. Skripsi. Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta
- Indrayani. L., Soetjipto, H., dan Sihasale, L. 2006. *Skrining Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Daun Pecut Kuda (Stachytarpheta jamaicensis L. vahl) terhadap Larva Udang Artemia salina leach*. Salatiga: Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Kristen Satya Wacana.
- Indriana, 2006, Uji Banding Efektivitas Ekstrak Rimpang Temu Kunci (*Kaemferia pandurata Roxb*) 10% dengan Ketokonazol 2% Secara In Vitro terhadap Pertumbuhan *C. albicans* pada Kandidiasis Vaginalis, *Karya Tulis Ilmiah*, Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang.
- Jawetz, E., et al. 1995. Mikrobiologi untuk Profesi kesehatan, Edisi 16. Alih bahasa oleh Dr. H. Tonang. Jakarta: EG

- Jawetz, Melnick, dan Adelberg' s. 2004. Mikrobiologi Kedokteran, Ed 23, Hal 233, 235. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Kavanagh, F. 1972. Analytical Microbiology. Vol II. New york and London: Academic Press. Hal 190-1
- Kader, Md.A., Parvin, S., Chowduri, Md.A.U., dan Harque, Md.E. 2012. Antibacterial, Antifungal and Insecticidal Activities of *Ruellia tuberosa* L. Root Extract. *Journal Department of Pharmacy*. University of Rajshahi. Bangladesh
- Khopkar, S. M. 2003. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta: UI Press.
- Kusumaningtyas, E., Sukmawati, L., dan Astuti, E. 2008. Penentuan Golongan Bercak Senyawa Aktif Ekstrak n-heksan *Alpinia galanga* terhadap *Candida albicans* dengan Bioautografi dan Kromatografi Lapis Tipis. *Jurnal JITV*. Vol 13 No. 4 Hal 323-328. Jakarta
- Lathifah, Q. A. 2008. Uji Efektivitas Ekstrak Kasar Senyawa Antibakteri pada Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) dengan Variasi Pelarut. Skripsi. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Liu J dan Nes W D. 2009. Steroidal triterpenes: design of substrate-based inhibitors of ergosterol and sitosterol synthesis. *Molecules*. 14(11): 4690-706.
- Mangunwardoyo, W., Cahyaningsih, E., dan Usia, T. 2009. Ekstraksi dan Identifikasi Senyawa Antimikroba Herba Meniran (*Phyllanthus niruri* L.). *jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. Vol 7 No. 2 Hal 57-63. Jakarta
- Mansjoer, Arif, dkk. 2000. *Kapita Selekta Kedokteran*, Edisi 3, Medica Aesculpalus, FKUI, Jakarta.
- Masrkham. K.R. 1988. *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*. Terjemahan Kosasih Padmawinata. ITB bandung
- Marlin, R., Marwoto, J., dan Salni. 2015. Uji Aktivitas Fraksi Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) Terhadap Jamur *Candida albicans* Secara In Vitro. *Jurnal Seminar Nasional Forum Dosen Indonesia*. ISSN: 2460-5271. Bagian Biologi Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya. Palembang.
- Marnoto, T., Gogot, H., Dewi, G., dan Fendy, A. P. 2012. Ekstraksi Tannin Sebagai Bahan Pewarna Alami dari Tanaman Putrimalu (*Mimosa Pudica*) Menggunakan Pelarut Organik. *Reaktor*, 14 (1): 39-45.
- Maulida R, Guntarti A. 2015. Pengaruh ukuran partikel beras hitam (*Oryza sativa* L.) terhadap rendemen ekstrak dan kandungan total antosianin. *Pharmaciana*.

- Maurilla, Metta. 2015. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Bunga Petai (*Parkia speciosa* Hassk.) terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922. Fakultas Farmasi. Universitas Sanata Dharma
- Moore-Landecker, M.E. (1996), *Fundamentals of the fungi*, Fourth edition, PrenticeHall, Inc., New Jersey.
- Mukhlis, 2010, Ekstraksi Zat Warna Alami dari Kulit Batang Jamblang (*Syzygium cumini*) sebagai Badan dasar Pewarna Tekstil, FKIP Unsyiah Darussalam, Banda Aceh.
- Nurmillah, O. Y. 2009. *Kajian Aktivitas Antioksidan dan Antimikroba Ekstrak Biji, Kulit Buah, Batang, dan Daun Tanaman Jarak Pagar (Jatropha curcas L.)*. Skripsi. Institut Pertanian Bogor.
- Nursal. 2005. Kandungan Senyawa Kimia Ekstrak Daun Lengkuas (*Lactuca indica L.*) Toksisitas dan Pengaruh Subletalnya Terhadap Mortalitas Larva Nyamuk *Aedes aegypti*. Skripsi. Medan: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sumatera Utara.
- Padmawinata, K dan Soediro. 1995. *Cara Kromatografi Preparatif*. Bandung : Penerbit ITB.
- Pelezar, M.J. 1988. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Terjemahan Hadioetomo. UI-Press Jakarta.
- Pradana, F. 2014. Identifikasi Flavonoid dengan pereaksi Geser dan pengaruh ekstrak etanol 70% umbi binahong (*Anredera cordifolia Ten. Steenis*) terhadap Kadar Glukosa Darah Tikus Induksi Aloksan. Skripsi. UIN Maulana malik Ibrahim Malang
- Pratiwi, S.T. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Jakarta: Erlangga
- Prawesti. E. Y. D. 2008. Formulasi Tablet Kunyah Ekstrak Rimpang Temu Putih (*Curcuma Zedoaria (Berg) Roscoe*) dengan Kombinasi Bahan Pengisi Manitol-Laktosa. Surakarta: Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Poedjiadi, A. Dan Supriyanti, T. 1994. *Dasar-Dasar Biokimia*. Jakarta: UI Press.
- Purwantini, I., Santosa, D., dan Cahyanto, H.A. 2000. Aktivitas Antifungi Ekstrak Buah Seledri. *Traditional Medicine Journal*. Fakultas Farmasi. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta
- Puspita, I.A. 2012. Performa Flokulasi Bioflokulan DYT Disiapkan melalui Ekstraksi pada beragam Tingkat Keasaman dan kekuatan Ion terhadap Turbiditas Larutan Kaolin. Bandung. Universitas Pendidikan Indonesia
- Qardhawi, Y. 1998. *Ibadah Dalam Islam*. Cet 1 Bina Ilmu. Surabaya

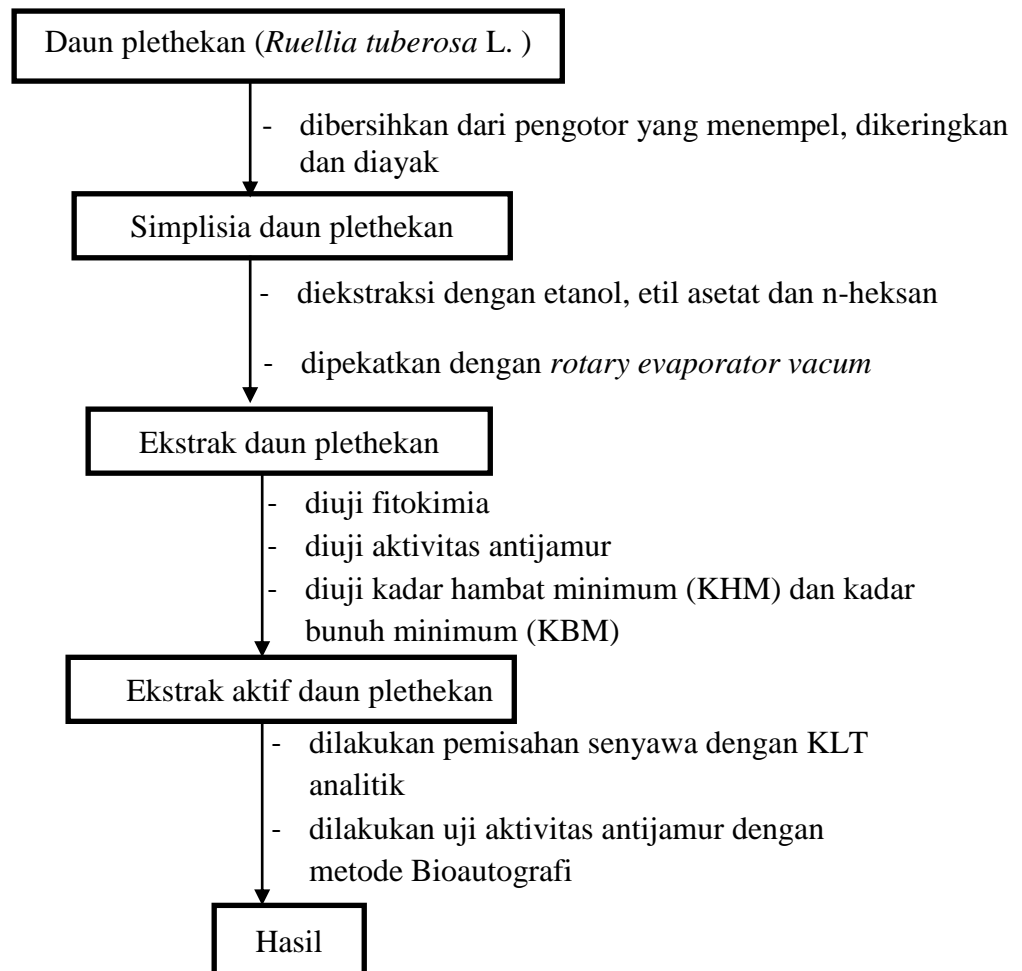
- Raharjo, B., Erwiyani, AR., Susana, MASD. 2012. Uji Aktivitas Antijamur dan Bioautografi Ekstrak Etanol Daun kelor (*Moringa oleifera Lamk.*) terhadap *Malessizia furfur*. *Skripsi*. Semarang. Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Ngudi Waluyo Unggaran
- Rahayu, S.S. 2009. "Ekstraksi" (online), (http://www.chem-istry.org/materi_kimia/kimia-industri/teknologi-proses/ekstraksi/), diakses hari Minggu 02 Oktober 2016).
- Ramdja, A. F., R.M. Army Aulia., Pradita Mulya. 2009. Ekstraksi Kurkumin Dari Temulawak dengan Menggunakan Etanol. *Jurnal Teknik Kimia, No. 3, Vol. 16*. Jurusan Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Sriwijaya
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tingkat Tinggi*. Bandung: ITB
- Sa'adah, L. 2010. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Tanin dari Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*). *Skripsi*. Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim, Malang
- Salni. 2003. Karakteristik dan Uji Aktivitas Tropikal Senyawa Antibakteri dari Daun Karamutung (*Rhodomlyrtus tomentosa Ait Hassk*). *Dissertasi*. ITB. Bandung
- Sastrohamidjojo, H. 2005. *Kromatografi*. Yogyakarta: Penerbit Liberty Yogyakarta
- Senthilkumar, P., Sambath, R., dan Vasantharaj, S. 2013. Antimicrobial Potential and Screening of Antimicrobial Compounds of *Ruellia tuberosa L.* Using GC-MS. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. Hal 184-188. PG & Research Department of Biotechnology, Hindustan College of Arts and science, Coimbatore, Tamilnadu. India
- Setyowati, H., Hanifah, H.Z., dan Nugraheni, Rr. P. 2014. Krim Kulit Buah Durian (*Durio zibethinus L.*) sebagai Obat Herbal pengobatan Infeksi Jamur *Candida albicans*. *Jurnal Media Farmasi Indonesia*. Vol 8 No. 2 Hal 560-573. Semarang
- Siswandono dan Soekardjo. (1995). *Kimia Medisinal*. Surabaya: Halaman 544. Penerbit Airlangga University Press.
- Sitorus, Saleh, C., dan Nursanti. 2012. Uji Hipoglikemik Ekstrak Etanol Umbi. *Anredera cordifolia [Ten.] Steenis*. *Jurnal*. Samarinda: Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Mulawarman. Vol 11. hlm: 96-99
- Sobel, J.D. 2007. Vulvovaginal Candidosis. *The Lancet*; 369:1961-1971 dalam Prasari, Sotya. 2009. Kolonisasi *Candida* Species pada Wanita pengguna Kontrasepsi Hormonal dan Non Hormonal. [tesis]. Pascasarjana UGM Yogyakarta.

- Sriwahyuni I. 2010. Uji fitokimia ekstrak tanaman anting-anting (*Acalypha Indica* Linn) dengan variasi pelarut dan uji toksisitas menggunakan brine shrimp (*artemia salina leach*). Skripsi. Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim. Malang
- Stout, David dalam Hasim. 2003. Menanam Rumput, Memanen Antibiotik. <http://www.kompas.com>
- Sukandar, E.Y., Suwendar, dan Ekawati, E., 2006, Aktivitas Ekstrak Etanol Herba Seledri (*Apium graveolens*) dan Daun Urang Aring (*Eclipta prostrata* (L.)L.) terhadap *Pityrosporum ovale*, Majalah Farmasi Indonesia.
- Suganda, A. G., Sukandar, E. Y., dan Rahman A. A. 2003. Aktivitas Antibakteri dan Antifungi Ekstrak Etanol Daun *Allamanda cathartica* L. dan *Allamanda neriifolia* HOOK. *Jurnal Bahan Alam Indonesia* 2 (3) : 85 – 88
- Sunatmo, T.I. 2009. *Mikrobiologi Esensial*. Mikrobiologi IPB. Bogor.
- Sundari, D dan Winarno, M.W. 2001. Informasi Tumbuhan Obat sebagai Antijamur. *Tinjauan Kepustakaan Pusat Penelitian dan Pengembangan*. No 130 hal 28-31. Badan Penelitian dan Pengembangan kesehatan, Departemen Kesehatan RI. Jakarta
- Sutrisno. RB. 1993. *Pereaksi KLT (Kromatografi Lapis Tipis)*. Edisi I. Jakarta: Fakultas Farmasi Universitas Pancasila
- Syamsuhidayat, Srisugati. 2000. *Inventoris Tanaman Obat Indonesia: Citrus Aurantium*. Jakarta: Bakti Husada.
- Thomas, A.N.S. 2004. *Tanaman Obat Tradisional 2*. Yogyakarta: Kanisius.
- Tjampakasari, CR. 2006. *Karakteristik Candida albicans*. Cermin Dunia Kedokteran
- Townshend A. 1995. *Encyclopedia of Analytical Science*. Vol 2. London: Academic Press
- Trifany, A.W. 2012. Kromatografi kolom. <http://data-farmasi.blogspot.com>. Diakses pada 10 Desember 2013.
- Ullah, dkk. 2011. Hypoglycemic Activity of *Ruellia tuberosa* Linn (*Acanthaceae*) in Normal and Alloxan Induced Diabetic Rabbits. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences* Spring 2011: 7(2): 107-115.
- Utami, S.C. 2007. Uji Aktivitas Antijamur Ekstrak Etanolik Herba Jombang (*Taraxacum officinale*, *Webber et Wigger*) terhadap Jamur *Candida albicans* ATCC 10231 dan *Tricophyton rebrum* ATCC 28191. Surakarta Skripsi. Fakultas Farmasi. Universitas Setia Budi.

- Valgas, C., de Souza, M.C., Smânia, E.F.A., & Smânia Jr., A., 2007, Screening methods to determine antibacterial activity of natural products, *Brazilian Journal of Microbiology* 38, 369-380
- Voight, R. 1994. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*, h 579-80. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta
- Wagner, H. and Blatt, S., 1996, *Plant Drug Analysis-A Thin Layer Chromatography Atlas*, second edition, Springer, German.
- Widodo, N. 2007. Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Alkaloid yang Terkandung dalam Jmaur Tiram Putih (*Pleurotus ostreatus*). Skripsi
- Winarno, F.G. 2008. *Kimia Pangan dan Gizi: Edisi Terbaru*. Jakarta. Gramedia Pustaka Utama.
- Wiratmaja. I.G., I Gusti. BWK., I Nyoman. SW. 2011, "Pembuatan Etanol Generasi Kedua Dengan Memanfaatkan Limbah Rumput Laut *Eucaema Cottonii* Sebagai Bahan Baku", *Jurnal Ilmiah Teknik Mesin*, Vol. 5 No.1.
- Warsinah, Kusumawati, E. Dan Sunarto. 2011. Identifikasi Senyawa Antifungi dari Kulit Batang Kecapi (*Sandoricum koetjape*) dan Aktivitasnya Terhadap *Candida albicans*. *Majalah Obat Tradisional*. 16, (3)
- Wattimena JR, Sugiarto NC, Widiyanto MB, Sukandar EY, Soemardji AA, Setiabudi AR. 1991. *Farmakologi dan Terapi Antibiotik*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Wuart C, Hannah M, Yassim M, Hamimah H, Sulaiman M. 2005. Anti-microbial activity of *Ruellia tuberosa* L. *American Journal of Chinese Medicine*. 33(4): 683-685.
- Yulianty, Risfah., Herlina Rante, *et al.*, 2011. Skrining dan analisis KLT-bioautografi Senyawa antimikroba Beberapa Ekstrak Spons Asal Perairan Laut Pulau Barrang Lompo, Sulawesi Selatan. *Majalah Obat Tradisional*. 16 (02), 88-94
- Zahro, I. 2011. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Triterpenoid Ekstrak N-Heksan tanaman Anting-anting (*Acalypha Indica Linn.*) menggunakan Spektrofotometer Uv-Vis dan FTIR. Malang: Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang

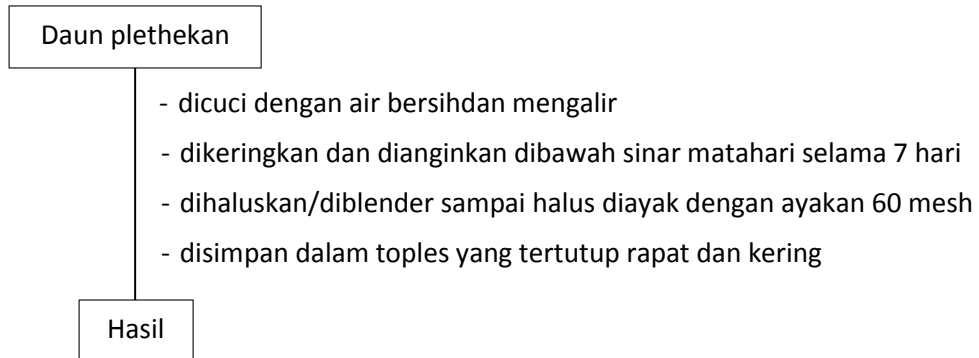
LAMPIRAN

Lampiran 1. Rancangan Penelitian

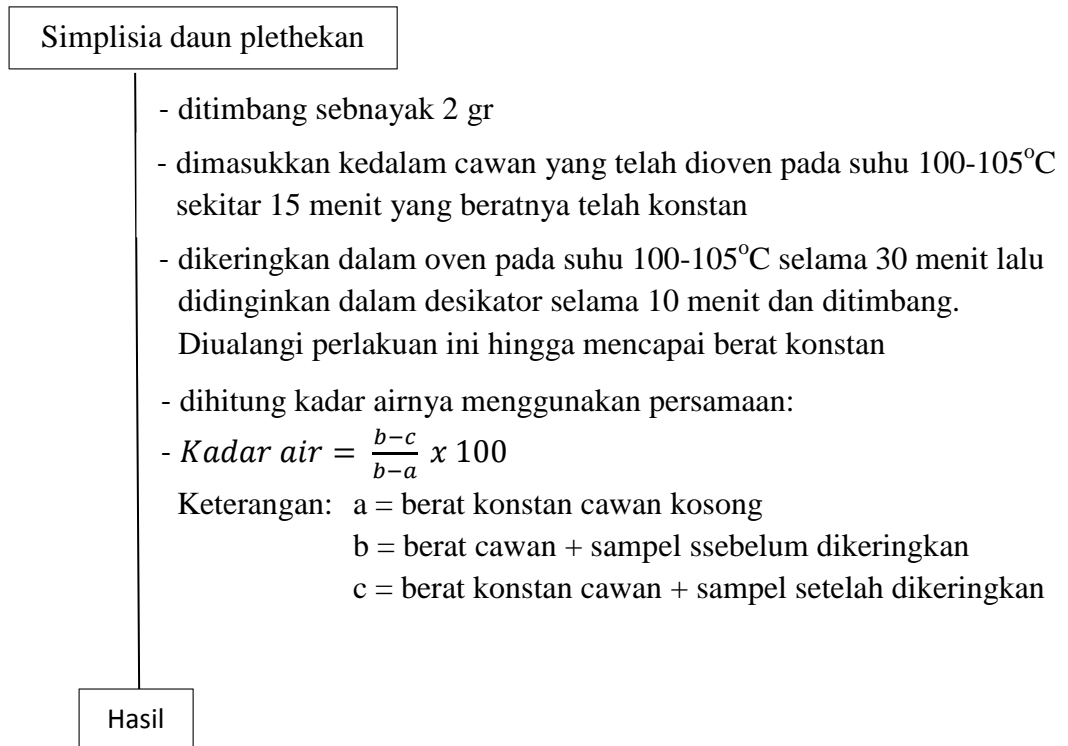


Lampiran 2. Diagram alir

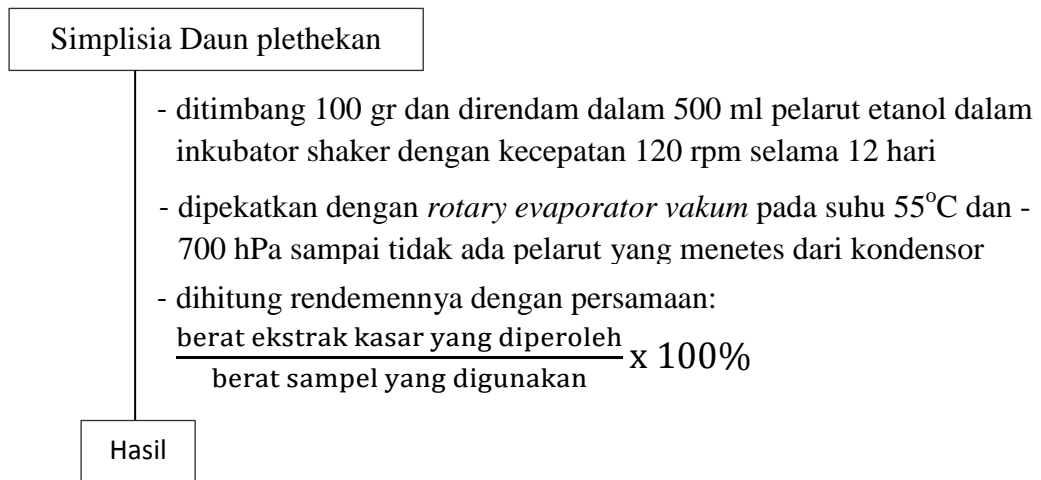
1. Preparasi Sampel



2. Pengukuran Kadar Air

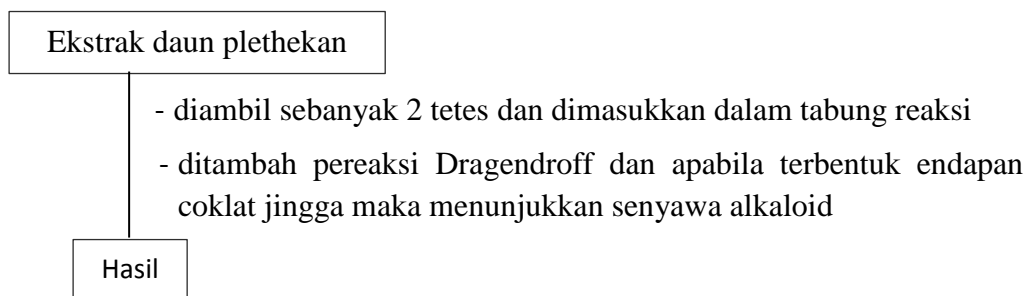


3. Ekstraksi Maserasi

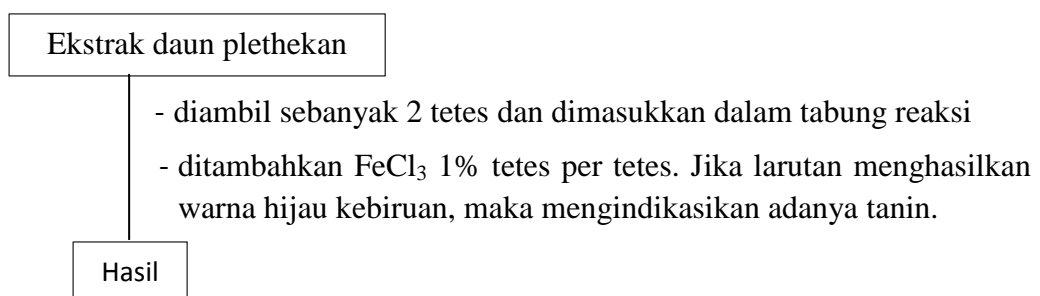


4. Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Etanol Daun Plethekan dengan Uji Fitokimia

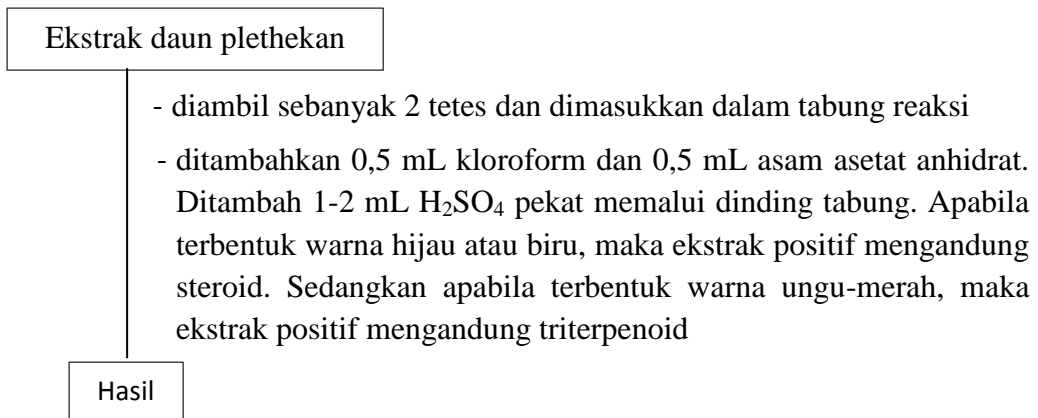
a. Uji Alkaloid



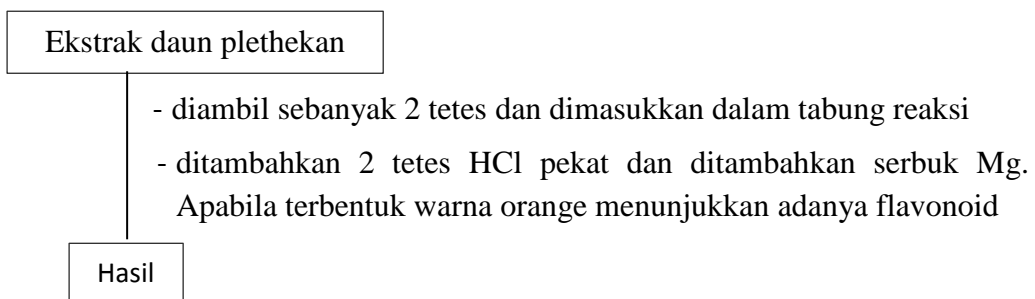
b. Uji Tanin



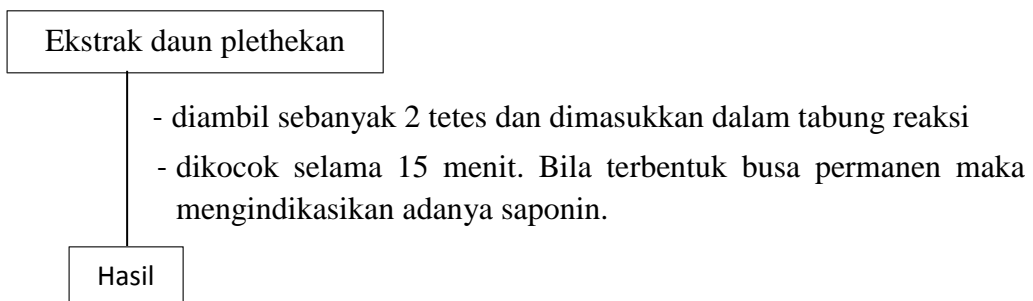
c. Uji Steroid dan Triterpenoid



d. Uji Flavonoid

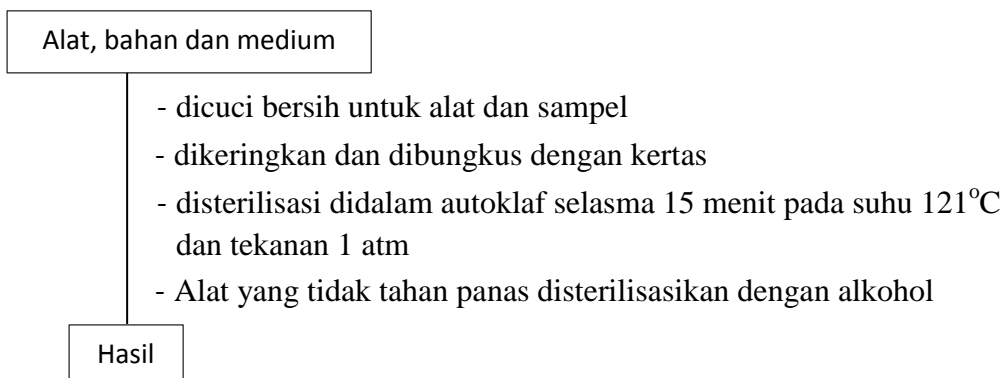


e. Uji Saponin

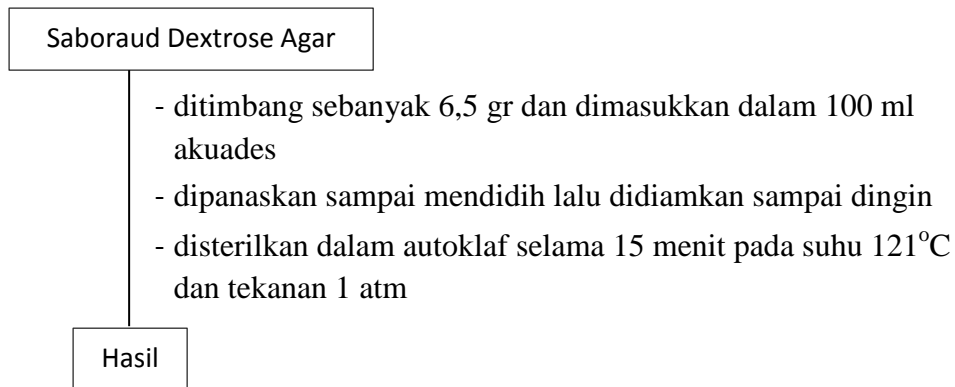


5. Uji Aktivitas Antijamur

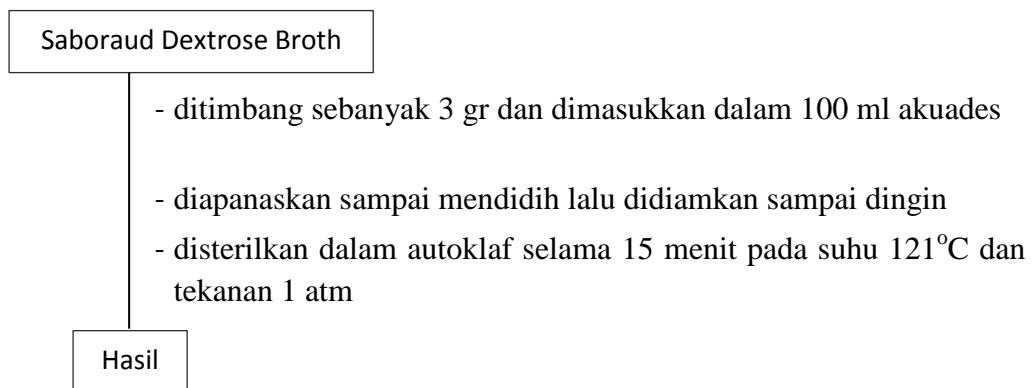
5.1 Sterilisasi



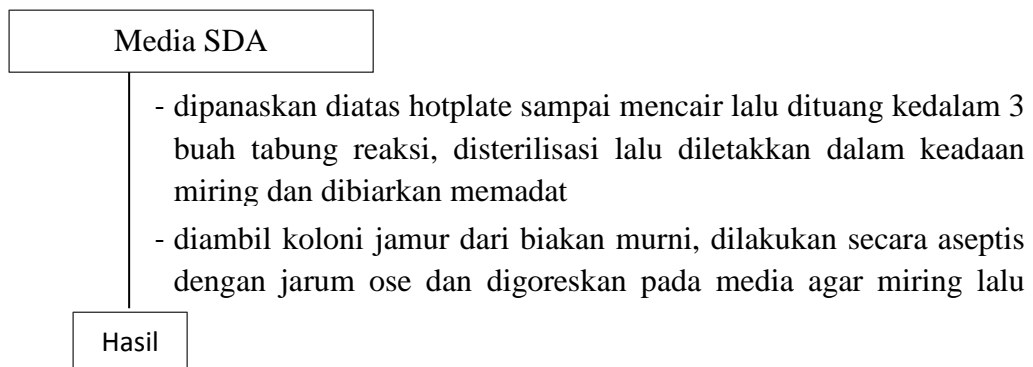
5.2 Pembuatan Media Saboraud Dextrose Agar (SDA)



5.3 Pembuatan Media Saboraud Dextrose Broth (SDB)



5.4 Peremajaan Biakan Jamur *Candida albicans*



5.5 Pembuatan Inokulum Jamur *Candida albicans*.

Inokulum *Candida albicans*

- Disuspensikan 1 ose jamur *Candida albicans* hasil tahap peremajaan kedalam 25 ml media SDB. diinkubasi pada suhu 37°C selam 24 jam
- Dibandingkan kekeruhannya dengan OD 0,39 atau setara dengan $1,25 \cdot 10^7$ Cfu/mL dengan menambahkan media SDB sebagai pelarut

Hasil

5.6 Uji Daya Hambat Ekstrak Daun Plethekan Terhadap Jamur *Candida albicans*

Suspensi jamur *Candida albicans*

- diambil sebanyak 0,5 ml dan dimasukkan kedalam cawan petri steril
- ditambahkan dengan 15 ml media SDA yang masih cair
- Dibiarkan memadat
- diletakkan kertas cakram yang telah direndam dalam 10% (0,1 g/mL) ekstrak daun plethekan dengan menggunakan pinset
- digunakan ketokanzol sebagai kontrol positif dan DMSO sebagai kontrol negatif
- diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah 18 jam diamati ada tidaknya zona bening yang terbentuk, apabila tidak terbentuk zona bening maka dilanjutkan inkubasi hingga jam ke 24
- diukur diameter zona bening yang terbentuk disekitar kertas cakram dengan jangka sorong

Hasil

5.7 Uji Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Uji Kadar Bunuh Minimum (KBM) Ekstrak Etanol Daun Plethekan

Ekstrak etanol daun plethekan

- dibuat variasi konsentrasi 10, 15, 20, 25 mg/ml dengan menggunakan DMSO sebagai pelarut nya
- dimasukkan kedalam 5 tabung reaksi yang telah berisi dengan 9 mL SDB steril dan ditambahkan 0,5 mL suspensi jamur *Candida albicans*. Masing-masing konsentrasi dibuat pada 3 tabung yakni untuk tiga kali pengulangan
- diambil 3 mL secara aseptis untuk dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 600 nm. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Divortex dan diukur nilai absorbansinya kembali
- Konsentrasi terendah yang dapat menghambat pertumbuhan jamur (KHM) ditunjukkan dengan tidak adanya kekeruhan setelah diinkubasi
- ditumbuhkan kultur pada tabung positif KHM secara *pour plate* pada media SDA steril. Diambil 10 μ L dari konsentrasi yang menunjukkan positif KHM, ditumbuhkan pada media SDA

Hasil

5.8 Pemisahan Senyawa dengan Kromatografi Lapis Tipis Analitik

Ekstrak aktif daun plethekan

- ditotolkan pada jarak 1 cm dari tepi bawah plat silika gel F₂₅₄ yang berukuran 2x20 cm dengan menggunakan pipa kapiler
- dikeringkandan dielusi dengan fase gerak n-heksa:etil asetat (1:1) untuk senyawa triterpenoid, kloroform:asam asetat:air (3:1,5:0,5) untuk senyawa tanin dan butanol:asam asetat:air (4:1:5) untuk senyawa flavonoid
- dikeringkan dengan alat pengering dan disemprot dengan pereaksi uap amoniak untuk flavonoid, FeCl₃ untuk tanin, LB untuk triterpenoid
- diperiksa dibawah sinar UV pada panjang gelombang 254 dan 366. Diamati masing-masing spot dengan masing-masing warna yang terbentuk

Hasil

5.9 Uji Aktivitas Antijamur dengan Metode Bioautografi

Plat silika gel F₂₅₄ hasil uji KLT

- ditempelkan diatas 100 ml media SDA yang telah diinokulasikan dengan 100 μ L biakan jamur *Candida albicans* selama 1 jam
- diangkat dan cawan petri diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam.
- diamati zona hambat yang terbentuk sebagai daerah terang yang tidak ditumbuhi jamur

Hasil

Lampiran 3. Pembuatan Reagen dan Perhitungan

1. Pembuatan Larutan HCl 2%

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$37\% \times V_1 = 2\% \times 25 \text{ mL}$$

$$V_1 = 1,35 \text{ mL} = 1,4 \text{ mL}$$

Jadi, untuk membuat larutan HCl 2% dilakukan dengan cara mengambil sebanyak 1,4 mL larutan HCl pekat 37% dan diencerkan dengan akuades di dalam labu ukur 25 mL dan ditambahkan akuades hingga tanda batas, kemudian dihomogenkan.

2. Pembuatan larutan Dragendroff

Larutan I : 0,6 gram $\text{Bi}(\text{NH}_3)_3$ dalam 2 mL HCl pekat dan 10 mL H_2O

Larutan II : 6 gram KI dalam 10 mL H_2O

Cara pembuatannya adalah larutan I dibuat dengan menimbang 0,6 gr $\text{Bi}(\text{NH}_3)_3$ dengan neraca analitik, kemudian serbuk tersebut dimasukkan dalam *beaker glass* 50 mL. Selanjutnya, diambil larutan HCl pekat sebanyak 2 mL menggunakan pipet ukur 5 mL di dalam lemari asap. Kemudian dimasukkan 10 mL akuades dan larutan HCl pekat 2 mL ke dalam *beaker glass* untuk melarutkan serbuk dengan dibantu oleh proses pengadukan.

Larutan II dibuat dengan menimbang 6 gr KI dengan neraca analitik dan dimasukkan ke dalam *beaker glass* 50 mL. Kemudian ditambahkan 10 mL akuades untuk melarutkan serbuk dengan bantuan pengadukan. Kedua larutan tersebut dicampur dengan 7 mL HCl pekat dan 15 mL H_2O .

3. Pembuatan larutan FeCl₃ 1%

$$\% \text{ Konsentrasi} = \frac{\text{gr terlarut}}{\text{gr terlarut} + \text{gr pelarut}} \times 100 \%$$

$$\text{gr terlarut} + \text{gr pelarut} = \frac{\text{gr terlarut}}{\% \text{ konsentrasi}} \times 100 \%$$

$$1 \text{ gr} + \text{gr pelarut} = \frac{1 \text{ gr}}{1 \%} \times 100 \%$$

$$\text{gr pelarut} = 100 \text{ gr} - 1 \text{ gr}$$

$$= 99 \text{ gr}$$

$$\text{Volume pelarut} = \frac{\text{gr pelarut}}{\text{BJ pelarut}} = \frac{99 \text{ gr}}{1 \text{ gr/mL}} = 99 \text{ mL}$$

Cara pembuatannya adalah ditimbang serbuk FeCl₃.6H₂O sebanyak 1 gr menggunakan neraca analitik dan dimasukkan ke dalam *beaker glass* 100 mL, kemudian ditambahkan akuades sebanyak 99 mL untuk melarutkan serbuk tersebut dengan bantuan pengadukan.

4. Pembuatan Reagen Lieberman-Burchard

$$\text{Asam sulfat pekat} = 5 \text{ mL}$$

$$\text{Asam asetat anhidrat} = 5 \text{ mL}$$

$$\text{Etanol absolut} = 50 \text{ mL}$$

Cara pembuatannya adalah asam sulfat pekat diambil sebanyak 5 mL dengan pipet volume 5 mL dan pengambilannya dilakukan di dalam lemari asap. Setelah itu, larutan asam sulfat dimasukkan ke dalam *beaker glass* 100 mL. Kemudian diambil larutan asam asetat anhidrat sebanyak 5 mL di dalam lemari asap dan dimasukkan ke dalam *beaker glass* yang telah berisi asam sulfat. Selanjutnya, diambil larutan etanol absolut 50 mL di dalam lemari asap dan dicampurkan ke dalam asam sulfat dan asam asetat anhidrat. Kemudian, ketiga

campuran larutan tersebut dipindahkan ke dalam botol kaca dan didinginkan di dalam lemari pendingin.

6. Pembuatan Larutan NaCl 0,9%

Sebanyak 0,9 gram NaCl dilarutkan ke dalam 100 mL akuades untuk mendapatkan larutan NaCl dengan konsentrasi 0,9%.

7. Pembuatan Konsentrasi Ekstrak Daun Plethekan

- Pembuatan Larutan Stock dengan Konsentrasi 25 mg/mL

Larutan stock dengan konsentrasi 25 mg/mL dibuat dengan cara melarutkan sebanyak 1,25 gr ekstrak akar plethekan kedalam 5 mL larutan DMSO.

- Pembuatan Larutan dengan Konsentrasi 20 mg/mL

$$\begin{aligned} M_1 \times V_1 &= M_2 \times V_2 \\ 25 \text{ mg/mL} \times V_1 &= 20 \text{ mg/mL} \times 5 \text{ mL} \\ V_1 &= 4 \text{ mL} \end{aligned}$$

Jadi, untuk membuat larutan ekstrak dengan konsentrasi 20 mg/mL sebanyak 5 mL dapat dilakukan dengan cara mengambil sebanyak 4 mL larutan stock dan dilarutkan dengan DMSO hingga 5 mL.

- Pembuatan Larutan dengan Konsentrasi 15 mg/mL

$$\begin{aligned} M_1 \times V_1 &= M_2 \times V_2 \\ 20 \text{ mg/mL} \times V_1 &= 15 \text{ mg/mL} \times 5 \text{ mL} \\ V_1 &= 3,75 \text{ mL} \end{aligned}$$

Jadi, untuk membuat larutan ekstrak dengan konsentrasi 15 mg/mL sebanyak 5 mL dapat dilakukan dengan cara mengambil sebanyak 3,75 mL larutan stock dan dilarutkan dengan DMSO hingga 5 mL.

- Pembuatan Larutan dengan Konsentrasi 10 mg/mL

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$15 \text{ mg/mL} \times V_1 = 10 \text{ mg/mL} \times 5 \text{ mL}$$

$$V_1 = 3,33 \text{ mL}$$

Jadi, untuk membuat larutan ekstrak dengan konsentrasi 10 mg/mL sebanyak 5 mL dapat dilakukan dengan cara mengambil sebanyak 3,33 mL larutan stock dan dilarutkan dengan DMSO hingga 5 mL.

8. Pembuatan larutan kontrol positif

Larutan kontrol positif yang digunakan yaitu ketokanzol dengan konsentrasi 10% (b/v). Larutan ini dibuat dengan cara tablet ketokanzol digerus dan ditimbang sebanyak 0,1 gr dan dilarutkan dalam 1 mL akuades.

9. Pembuatan larutan ekstrak daun plethekan 10%

Larutan ekstrak daun plethekan yang akan digunakan dalam uji aktivitas antijamur adalah konsentrasi 10% (b/v). Larutan ini dibuat dengan ekstrak kental daun plethekan ditimbang sebanyak 0,1 gr dan dilarutkan dalam 1 mL DMSO.

10. Pembuatan larutan ekstrak daun plethekan 20.000 ppm

Larutan ekstrak daun plethekan yang akan digunakan dalam KLTA adalah konsentrasi 20.000 ppm. Larutan ini dibuat dengan ekstrak kental daun plethekan ditimbang sebanyak 20 mg dan dilarutkan dalam 1 mL DMSO.

Lampiran 4. Tabel Data analisis

1. Data Hasil Pengukuran Kadar Air Simplisia Daun Plethekan

Tabel. 1 Berat Cawan Kosong

No. Cawan	Berat Cawan Kosong					Rata-Rata
	I	II	III	IV	V	
Ulangan I	56,9666	56,9633	56,9626	56,9624	56,9623	56,96344
Ulangan II	65,9234	65,9194	65,9190	65,9189	65,9187	65,91988
Ulangan III	56,8663	56,8628	56,8631	56,8629	56,8628	56,86358

Tabel. 2 Berat Cawan + Sampel

No. Cawan	Berat Cawan + Sampel					Rata-Rata
	I	II	III	IV	V	
Ulangan I	58,9434	58,7665	58,7601	58,7579	58,7577	58,79712
Ulangan II	67,9023	67,7040	67,7028	67,7027	67,7025	67,74286
Ulangan III	58,8658	58,6893	58,7103	58,7100	58,7098	58,73704

2. Data hasil analisa kadar air ekstrak kering daun plethekan

Tabel. 3 Rata-rata hasil analisa kadar air ekstrak kering daun plethekan

Ulangan	Kadar air (%)
I	7,39
II	8,04
III	6,43
Rata-rata	7,29

3. Hasil perhitungan zona hambat yang terbuk saat uji aktivitas antijamur Ekstrak Etanol Daun Plethekan terhadap *Candida albicans*

Tabel. 4 Zona hambat jamur *Candida albicans*

Perlakuan	Rerata zona hambat ekstrak(mm)	Zona hambat kontrol positif (mm)	Kekuatan daya hambat (David Stout, 2003)
Ulangan 1	22	26	Sangat kuat
Ulangan 2	23	23	Sangat kuat
Ulangan 3	22	25	Sangat kuat
Ulangan 4	22,5	25	Sangat kuat

4. Perhitungan Rerata Zona Hambat yang Terbentuk saat Uji Aktivitas Antijamur Ekstrak Etanol Daun Plethekean terhadap *Candida albicans*

$$\begin{aligned} \text{zona hambat rata - rata ekstrak} &= \frac{\text{ulangan 1} + \text{ulangan 2} + \text{ulangan 3} + \text{ulangan 4}}{4} \\ &= \frac{22 + 23 + 22 + 22,5}{4} \\ &= 22,4 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{zona hambat rata - rata kontrol (+)} &= \frac{\text{ulangan 1} + \text{ulangan 2} + \text{ulangan 3} + \text{ulangan 4}}{4} \\ &= \frac{26 + 23 + 25 + 25}{4} \\ &= 24,8 \end{aligned}$$

Lampiran 5. Data hasil Uv-vis tahap KHM

1. Sebelum Inkubasi

Absorbansi KHM

Tanggal Analisa : 18 Agustus 2016

Advanced Reads Report

Report time 8/18/2016 2:01:00 PM
 Method
 Batch name D:\Nur Mutammimma\Absorbansi KHM (18-08-2016).BAB
 Application Advanced Reads 3.00 (339)
 Operator Rika

Instrument Settings

Instrument Cary 50
 Instrument version no. 3.00
 Wavelength (nm) 600.0
 Ordinate Mode Abs
 Ave Time (sec) 0.1000
 Replicates 3
 Sample averaging OFF

Comments:

Zero Report

Read	Abs	nm
Zero	(0.1043)	600.0

Analysis

Collection time 8/18/2016 2:01:00 PM

Sample	F	Mean	SD	%RSD	Readings
Kontrol Negatif					0.0381
					0.0377
		0.0381	0.0003	0.86	0.0384
Kontrol Positif					0.0542
					0.0532
		0.0532	0.0010	1.85	0.0522
CA 10 1					0.0153
					0.0125
		0.0136	0.0015	10.94	0.0130
CA 10 2					0.0166
					0.0165
		0.0174	0.0014	7.92	0.0189
CA 10 3					0.0122
					0.0123
		0.0122	0.0002	1.62	0.0120
CA 15 1					0.0117
					0.0123
		0.0127	0.0012	9.28	0.0140
CA 15 2					0.0208
					0.0164
		0.0172	0.0033	19.04	0.0144
CA 15 3					0.0138
					0.0136
		0.0137	0.0001	0.81	0.0137

CA 20 1				0.0143 0.0122 0.0156
	0.0140	0.0017	12.27	
CA 20 2				0.0162 0.0156 0.0190
	0.0169	0.0018	10.85	
CA 20 3				0.0138 0.0125 0.0156
	0.0140	0.0015	10.89	
CA 25 1				0.0158 0.0157 0.0159
	0.0158	0.0001	0.69	
CA 25 2				0.0196 0.0179 0.0171
	0.0182	0.0013	7.15	
CA 25 3				0.0143 0.0144 0.0149
	0.0145	0.0003	2.10	

Results Flags Legend

R = Repeat reading

2. Setelah Inkubasi

Absorbansi KHM

Tanggal Analisa : 19 Agustus 2016

Advanced Reads Report

Report time 8/19/2016 1:24:18 PM
 Method
 Batch name D:\Nur Mutammimma\Absorbansi KHM (19-08-2016).BAB
 Application Advanced Reads 3.00 (339)
 Operator Rika

Instrument Settings

Instrument Cary 50
 Instrument version no. 3.00
 Wavelength (nm) 600.0
 Ordinate Mode Abs
 Ave Time (sec) 0.1000
 Replicates 3
 Sample averaging OFF

Comments:

Zero Report

Read	Abs	nm
Zero	(0.1483)	600.0

Analysis

Collection time 8/19/2016 1:24:18 PM

Sample	F	Mean	SD	%RSD	Readings
Kontrol Negatif					-0.0065
					-0.0049
		-0.0055	0.0009	-16.18	-0.0050
Kontrol Positif					2.0650
					2.0420
		2.0563	0.0125	0.61	2.0620
CA 10 1					0.8582
					0.8514
		0.8544	0.0034	0.40	0.8538
CA 10 2					0.8687
					0.8774
		0.8750	0.0055	0.63	0.8789
CA 10 3					1.2878
					1.2896
		1.2876	0.0022	0.17	1.2853
CA 15 1					0.6474
					0.6494
		0.6496	0.0023	0.36	0.6520
CA 15 2					0.6096
					0.6190
		0.6176	0.0074	1.20	0.6243
CA 15 3					0.6834
					0.6779
		0.6790	0.0040	0.58	0.6758
CA 20 1					0.5438

	0.5390	0.0042	0.78	0.5376 0.5358
CA 20 2				0.5020 0.5063 0.5149
	0.5077	0.0065	1.29	
CA 20 3				0.5233 0.5262 0.5201
	0.5232	0.0030	0.58	
CA 25 1				0.5145 0.5125 0.5112
	0.5127	0.0017	0.32	
CA 25 2				0.5204 0.5150 0.5139
	0.5164	0.0035	0.68	
CA 25 3				0.4767 0.4774 0.4773
	0.4772	0.0004	0.08	

Results Flags Legend

R = Repeat reading

Lampiran 6. Dokumentasi Proses Preparasi, Ekstraksi dan Pemekatan Ekstrak



Sampel kering daun plethekan
sebanyak 650 gr



Proses maserasi daun plethekan
dengan pelarut etanol



Proses penyaringan ekstrak
hasil maserasi dengan pompa
vakum



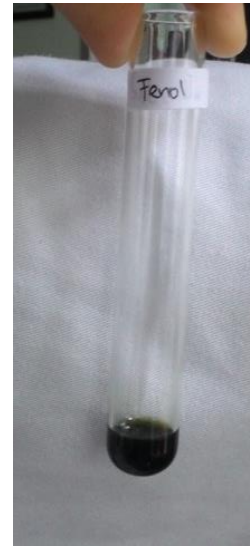
Proses pemisahan ekstrak dengan
pelarutnya menggunakan rotary
evaporator vakum



Ekstrak kental daun plethekan yang
telah terpisah dengan pelarutnya

Lampiran 7. Hasil Uji fitokimia Ekstrak Etanol Daun Plethekan

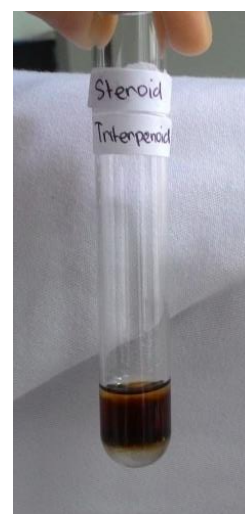
Uji fitokimia senyawa saponin dengan penambahan aquades dan pengocokan



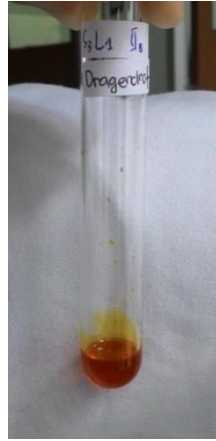
Uji fitokimia senyawa fenol dengan penambahan air panas dan pereaksi FeCl_3



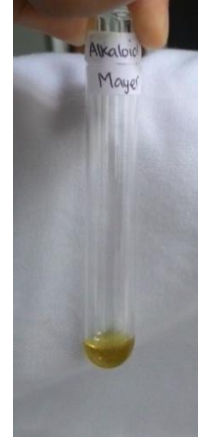
Uji fitokimia senyawa tanin dengan penambahan pereaksi FeCl_3



Uji fitokimia senyawa steroid/triterpenoid dengan penambahan kloroform, asam asetat dan H_2SO_4 pekat



Uji fitokimia senyawa flavonoid dengan reagen dragendroff



Uji fitokimia senyawa flavonoid dengan reagen mayer



Uji fitokimia senyawa flavonoid dengan penambahan HCl dan serbuk

Lampiran 8. Proses Peremajaan dan Pembuatan Inokulum Jamur *Candida albicans*



Biakan murni jamur *Candida albicans* dari fakultas pertanian UB



Jamur *Candida albicans* yang telah diremajakan di media SDA miring



Prproses inkubasi pembuatan inokulum dalam SDB dengan shaker pada suhu ruang

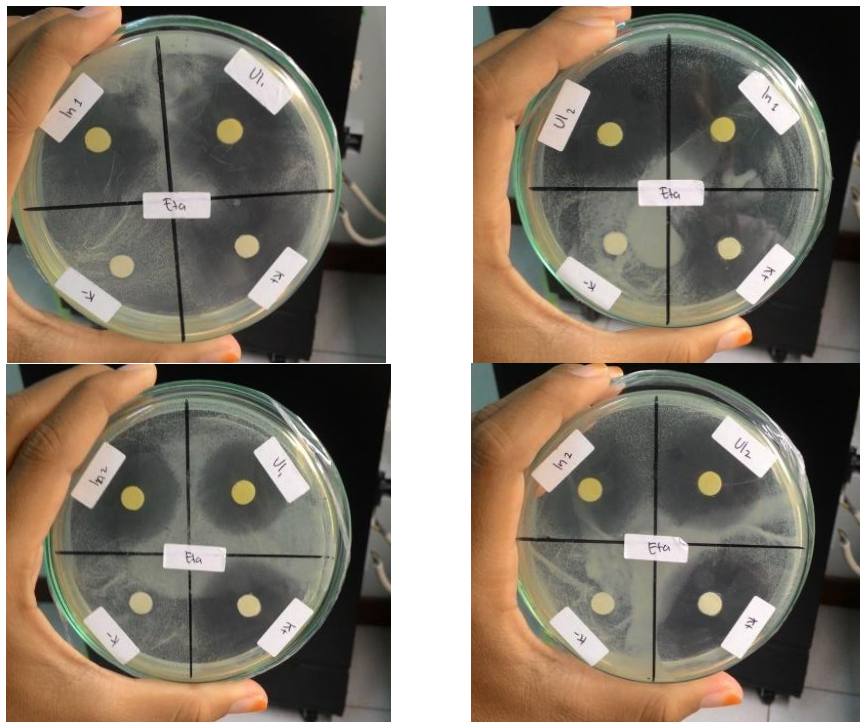


Proses pembuatan inokulum jamur *Candida albicans* dalam media SDB

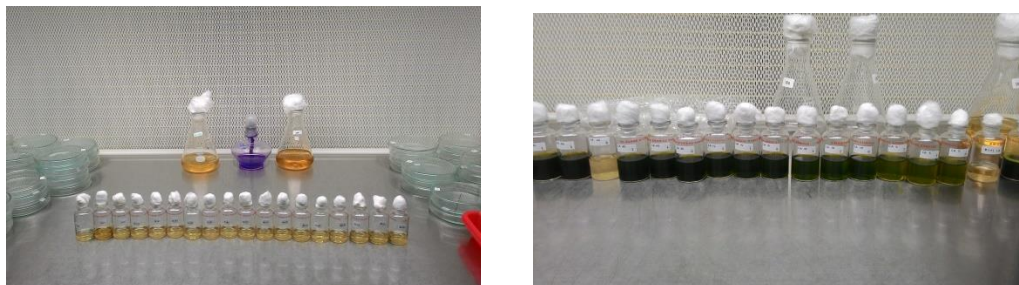


Obat ketoconazole sebagai kontrol positif pada uji aktivitas antijamur

Lampiran 9. Hasil Uji Aktivitas Antijamur dan Uji KHM & KBM Ekstrak Etanol Daun Plethekan terhadap *Candida albicans*



Hasil zona hambat ekstrak etanol daun plethekan 10% terhadap *Candida albicans*



Tahap uji KHM metode dilusi tabung

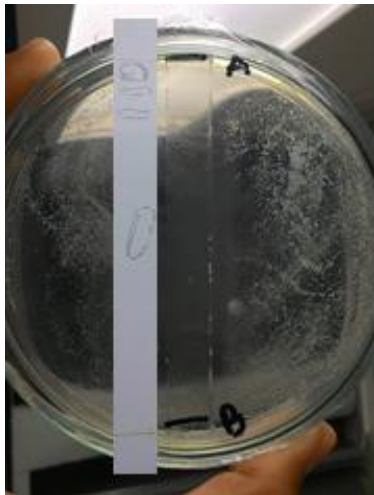
Lampiran 10. Dokumentasi Proses Uji KLT-Bioautografi



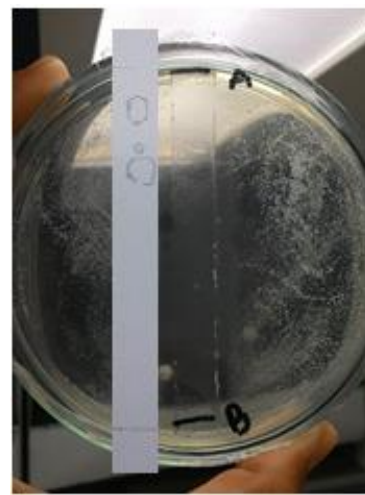
Tahap uji kromatografi lapis tipis



Tahap uji bioautografi senyawa
triterpenoid



Tahap uji bioautografi senyawa
tanin



Tahap uji bioautografi senyawa
flavonoid

Motto

Life is full of challenges
Not all the time we get what we want
But dont despair
Just keep struggle because..

“There is rainbow always after the rain”

HALAMAN PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. kedua orang tua (Bapak Sahrowardi dan Ibu Suprihatin) kakak (Zainal Arifin) serta keluarga besar yang senantiasa menanti, mendengarkan seluruh keluh kesah penulis, memberikan dukungan, semangat dan do'a selama proses mengerjakan karya ini,
2. pembimbing, konsultan dan seluruh dosen kimia UIN Maliki Malang
3. sahabat-sahabat tim biokimia (tim bekatul, antibakteri dan molase) yang selalu menyelinapkan canda dan tawa diantara kesibukan penelitian di laboratorium.
4. Sahabat-sahabat terdekat penulis (kuvet retak) dan seluruh teman-teman kimia angkatan 2012
5. semua pihak yang terlibat dalam proses pencapaian tugas akhir ini dari masa kuliah, KKN (Titoyudho), PKLI (Perum Jasa Tirta I), dll., sampai dengan penyelesaian skripsi,