



**ISOLASI DAN KARAKTERISASI SENYAWA MAYOR SERTA
UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI LIKEN *Phyloporon
aciculare* (Ach.) Nyl TERHADAP *Staphylococcus aureus***

SKRIPSI

Oleh:

Chintya Permata Zahky Sukrisno Putri

NIM 162210101121

BAGIAN KIMIA FARMASI

FAKULTAS FARMASI

UNIVERSITAS JEMBER

2020



**ISOLASI DAN KARAKTERISASI SENYAWA MAYOR SERTA
UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI LIKEN *Phyloporon
aciculare* (Ach.) Nyl TERHADAP *Staphylococcus aureus***

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Farmasi
dan mencapai gelar Sarjana Farmasi

Oleh:

Chintya Permata Zahky Sukrisno Putri

NIM 162210101121

BAGIAN KIMIA FARMASI

FAKULTAS FARMASI

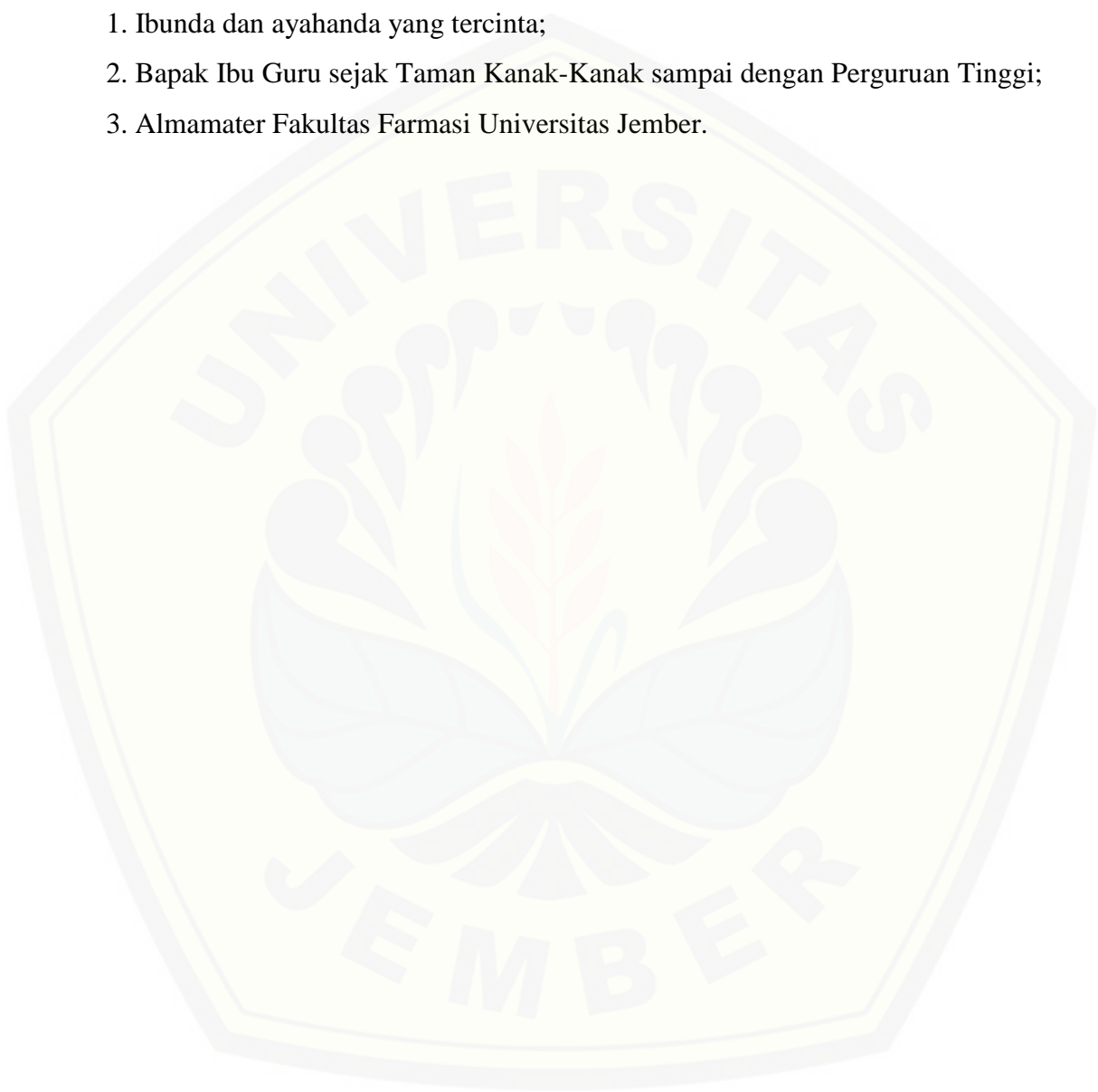
UNIVERSITAS JEMBER

2020

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Ibunda dan ayahanda yang tercinta;
2. Bapak Ibu Guru sejak Taman Kanak-Kanak sampai dengan Perguruan Tinggi;
3. Almamater Fakultas Farmasi Universitas Jember.



MOTO

Jer Basuki Mawa Beya*)

(tidak ada suatu keinginan yang dapat dicapai, tanpa pengorbanan)



* Fiolosi Jawa

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Chintya Permata Zahky Sykrisno Putri

NIM : 162210101121

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul ” ISOLASI DAN KARAKTERISASI SENYAWA MAYOR SERTA UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI LIKEN *Phyloporon aciculare* (Ach.) Nyl TERHADAP *Staphylococcus aureus*” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, XX

Yang menyatakan,

Chintya Permata Z.S.P

NIM162210101121

...

SKRIPSI

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI SENYAWA MAYOR SERTA
UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI LIKEN *Phyloporon
aciculare* (Ach.) Nyl TERHADAP *Staphylococcus aureus***

Oleh:

Chintya Permata Zahky Sukrisno Putri

NIM 162210101121

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : apt. Ari Satia N., S.F., GDipsc., Msc Res., Ph.D.

Dosen Pembimbing Anggota : apt. Dwi Koko Pratoko, S.Farm., M.Sc.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Mayor Serta Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Liken *Phyloporon Aciculare* (Ach.) Nyl Terhadap *Staphylococcus aureus*” karya Chintya Permata Zahky Sukrisno Putri telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : 19 Juni 2020

tempat : Fakultas Farmasi Universitas Jember

Tim Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama,

Dosen Pembimbing Anggota,

apt. Ari S.N.,S.F.,GDipsc.,Msc-Res.,Ph.D.
NIP. 197807212003121001

apt. Dwi Koko Pratoko,S.Farm.,M.Sc.
NIP. 198504282009121004

Tim Penguji

Dosen Penguji I

Dosen Penguji II

apt. Nia Kristiningrum, S.Farm.,M.Farm.
NIP. 198204062006042001

apt. Indah Purnama S., S.Si.,M.Farm.
NIP. 198304282008122004

Mengesahkan

Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember,

apt. Lestyo Wulandari, S.Si., M.Farm.

NIP 19760414 200212 2 001

RINGKASAN

Isolasi Dan Karakterisasi Senyawa Mayor Serta Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Liken *Phyloporon aciculare* (Ach.) Nyl Terhadap *Staphylococcus aureus*: Chintya Permata Zahky Sukrisno Putri: 162210101121; 2020; 85 Halaman; Fakultas Farmasi, Universitas Jember

Indonesia merupakan merupakan negara dengan biodiversitas terbesar kedua di dunia termasuk diantaranya merupakan tanaman obat. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa liken memiliki aktivitas antibakteri. Liken merupakan hasil simbiosis mutualisme antara jamur dengan alga. Terdapat banyak spesies liken yang belum teridentifikasi dan hingga saat ini penelitian terkait liken di Indonesia sangat terbatas. Pada penelitian ini sampel yang digunakan adalah liken *Phyloporon aciculare*. Senyawa mayor liken diisolasi menggunakan HPLC kemudian senyawa isolat dikarakterisasi dengan *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR) yang 1D-NMR ($^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$) dan 2D-NMR (gHSQC dan gHMBC) dan didapatkan senyawa mayor *P. aciculare* merupakan *methyl 2,4-dihydroxy-3,6-dimethylbenzoate* yang merupakan senyawa depside dengan rumus molekul $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_4$. Massa molekul dikonfirmasi menggunakan LRMS $[\text{M-H}]^+$ sinyal pada m/z 197. Uji aktivitas antibakteri akan dilakukan dengan metode mikrodilusi yang menggunakan konsentrasi tunggal sebesar 100 $\mu\text{g/ml}$ *P. aciculare* terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 yang didapatkan persen penghambatan sebesar sebesar $5,871 \pm 1,091\%$ dengan nilai $p < 0,05$. Persen penghambatan aktivitas bakteri tidak diatas 80% menunjukkan bahwa *P. aciculare* tidak memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan ridho-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul “Isolasi Dan Karakterisasi Senyawa Mayor Serta Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Liken *Phyloporon aciculare* (Ach.) Nyl Terhadap *Staphylococcus aureus*”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tentunya tidak lepas dari bantuan berbagai pihak baik secara lisan maupun tulisan, maka penulis berterima kasih kepada:

1. Allah SWT dan Nabi Agung Muhammad SAW yang selalu jadi panutan dalam hidup penulis;
2. Ibu apt. Lestyo Wulandari, S.Si., M.Farm selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember;
3. Bapak apt. Ari Satia Nugraha, S.F., GDipSc., M.Sc-Res., Ph.D. dan Bapak apt. Dwi Koko Pratoko, S.Farm., M.Sc. selaku dosen pembimbing utama dan anggota yang telah memberikan bimbingan serta arahan sehingga skripsi ini dapat tersusun dengan baik;
4. Ibu Nia apt. Kristiningrum, S.Farm., M.Farm. dan Ibu apt. Indah Purnama S., S.Si., M.Farm. selaku dosen penguji yang telah memberikan masukan berupa kritik dan saran yang membangun dalam penulisan skripsi ini;
5. Seluruh dosen dan teknisi Fakultas Farmasi Universitas Jember yang telah memberikan ilmu yang bermanfaat;
6. Ayah dan Mama serta Mbak Puspa dan Mbak Anda, terimakasih atas doa dan wejangan serta motivasi demi kelancaran dan keberhasilan dalam menyelesaikan studi di Fakultas Farmasi Universitas Jember;
7. Teman seperjuangan DUDRG, khususnya Lilla, Debby, Mas Idhok yang selalu jadi patner lembur dan makan bersama.

8. Teman-teman Project Soil yang bersama-sama saling membantu saat lembur untuk uji antibakteri.
9. Dinar dan Dini yang merupakan generasi ke-empat tim Liken yang turut membantu.
10. Teman seperjuangan, Ghea dan Nanda yang selalu suportif;
11. Arin dan Sari yang selalu mendengar keluh kesah selama ini;
12. Semua pihak yang telah berperan membantu menyelesaikan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa masih ada kelemahan dan kekurangan baik dalam segi materi ataupun teknik penulisan skripsi ini. Peneliti sangat mengharapkan kritik dan saran dari pembaca agar skripsi ini menjadi lebih baik.

Jember, Juni 2020

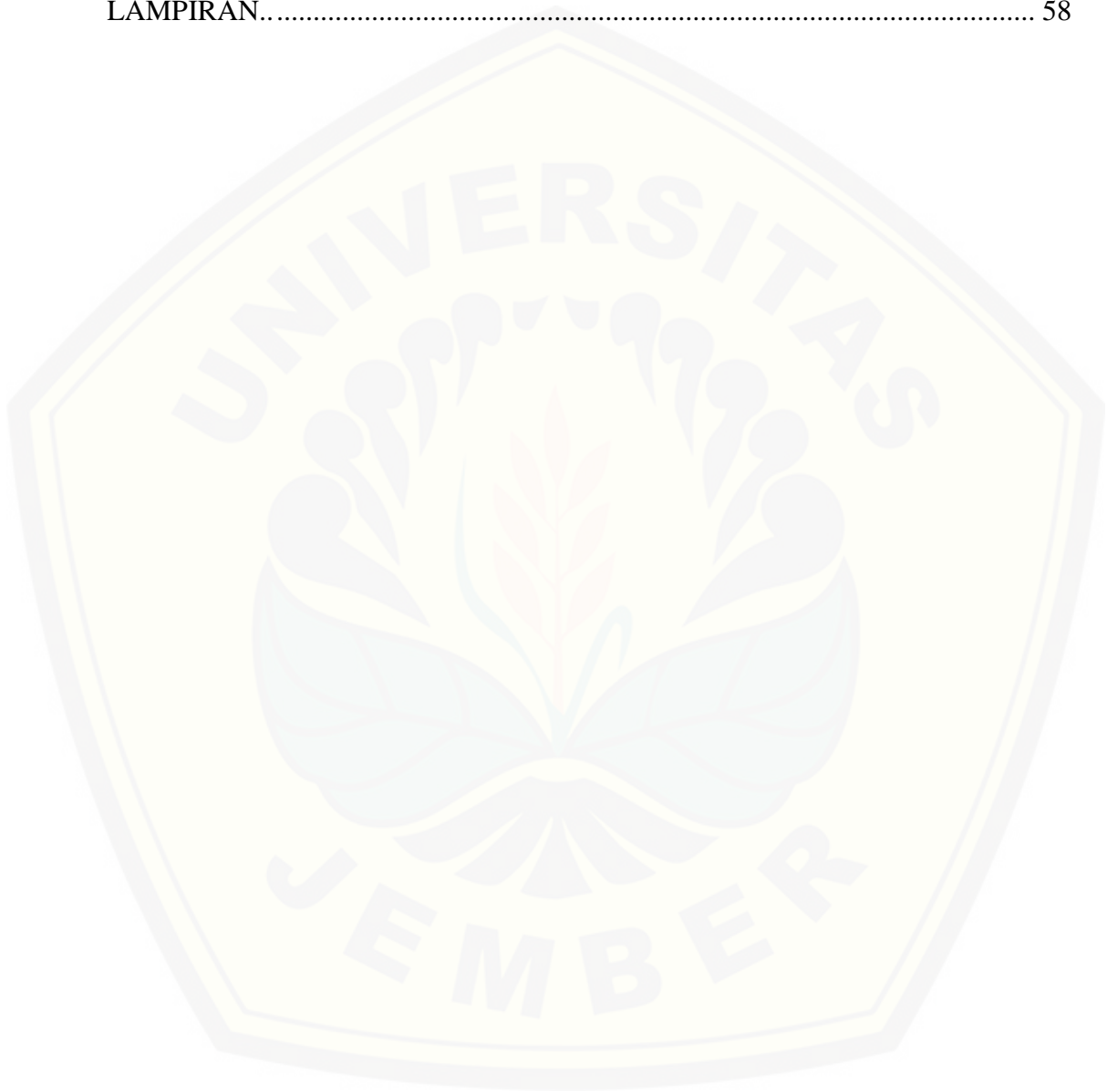
Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN PEMBIMBINGAN	v
HALAMAN PENGESAHAN.....	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA.....	viii
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xivi
TABEL ABREVIASI.....	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Penyakit Infeksi.....	5
2.2 Staphylococcus aureus	6
2.3 Antibakteri.....	8
2.4 Liken	9
2.4.1 Metabolit Sekunder Liken.....	11
2.4.2 Aktivitas Antibakteri Liken	11
2.5 Ekstraksi, Fraksinasi dan Isolasi	14
2.5.1 Ekstraksi.....	14
2.5.2 Fraksinasi.....	14
2.5.3 Isolasi	15
2.6 Karakterisasi Senyawa	16

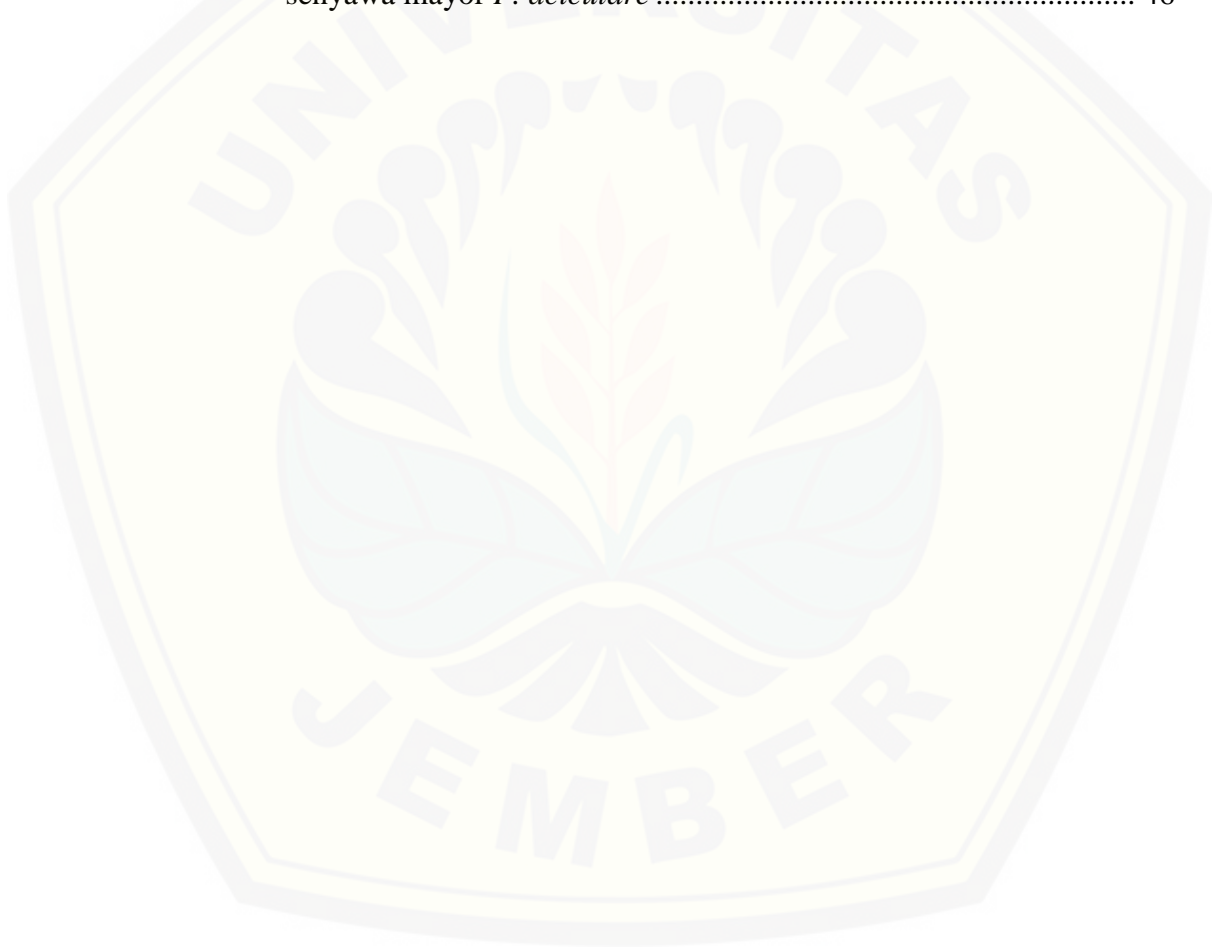
2.6.1	<i>Electrospray Ionization-Mass Spectrometry (ESI-MS)</i>	16
2.6.2	<i>Nuclear Magnetic Resonance (NMR)</i>	17
2.7	Uji Aktivitas Antibakteri.....	18
BAB 3.	METODOLOGI PENELITIAN	20
3.1	Jenis Penelitian.....	20
3.2	Skema Penelitian.....	20
3.3	Tempat dan Waktu Penelitian	21
3.4	Alat dan Bahan.....	21
3.4.1	Alat.....	21
3.4.2	Bahan	22
3.5	Variabel Penelitian	22
3.5.1	Variabel Bebas	22
3.5.2	Variabel Terikat	22
3.5.3	Variabel Terkendali.....	22
3.6	Definisi Operasional.....	23
3.7	Prosedur Penelitian.....	23
3.7.1	Pengumpulan Sampel dan Determinasi Tanaman	23
3.7.2	Pembuatan Simplisia.....	24
3.7.3	Ekstraksi.....	24
3.8	Pemisahan dan Pemurnian Metabolit Sekunder.....	24
3.8.1	Preparasi Sampel.....	24
3.8.2	Pengembangan Metode Isolasi.....	24
3.8.3	Isolasi Senyawa.....	25
3.9	Perekaman Data Spektrum Senyawa	25
3.9.1	<i>Electrospray Ionization Mass Spectrometry (ESI-MS)</i>	25
3.9.2	<i>Nuclear Magnetic Resonance (NMR)</i>	25
3.10	Uji Aktivitas Antibakteri.....	26
3.11	Analisa Data Uji Aktivitas Antibakteri	29
BAB 4.	HASIL DAN PEMBAHASAN	31
4.1	Determinasi Liken.....	31
4.2	Ekstraksi, Fraksinasi, dan Isolasi Liken <i>P. aciculare</i>	31
4.3	Karakterisasi Senyawa Mayor Liken <i>P. aciculare</i>	37

4.3	Uji Antibakteri	45
BAB 5. PENUTUP		48
5.1	Kesimpulan	48
5.2	Saran.....	48
LAMPIRAN.....		58



DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Data berbagai penelitian antibakteri terhadap liken famili Cladoniacea	12
Tabel 4.1	Perbandingan data spektroskopi ^1H dan ^{13}C NMR eksperimental dengan literatur Ragasa dkk. Tahun 2018.....	42
Tabel 4.2	Perbandingan data spektroskopi ^1H dan ^{13}C NMR eksperimental ^1H dan ^{13}C NMR ChemDraw	43
Tabel 4.3	Presentase penghambatan pertumbuhan bakteri <i>S. aureus</i> terhadap senyawa mayor <i>P. aciculare</i>	46



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Struktur bakteri gram positif dan negatif (Silhavy, 2010)	6
Gambar 2.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	7
Gambar 2.3 Liken <i>Phyloporom aciculare</i> Mutch, 2017 (A), Dokumentasi pribadi (B)	9
Gambar 2.4 Simbiosis jamur dengan alga.....	10
Gambar 2.5 Morfologi liken tipe Krustose (A), Foliose (B), Fruktiose (C)	10
Gambar 2.6 Komponen Beberapa struktur metabolit sekunder liken yaitu Depside (A), Depsidone (B), Dibenzofuran (C), Depsone (D)	11
Gambar 2.7 Komponen <i>Mass Spectrometry</i> (MS).....	16
Gambar 2.8 Mekanisme <i>Electrospray Ionization-Mass Spectrometry</i> (ESI-MS)	17
Gambar 3.1 Skema rancangan penelitian.....	20
Gambar 3.2 Rancangan <i>microplate</i> uji antibakteri liken <i>Phyloporon aciculare</i> terhadap <i>Staphylococcus aureus</i>	29
Gambar 4.1 Liken <i>P. aciculare</i>	31
Gambar 4.2 Ekstrak liken <i>P.aciculare</i> (A), Fraksi <i>n</i> -heksana liken <i>P.aciculare</i> (B)	31
Gambar 4.3 Kondisi analisis optimasi senyawa mayor liken <i>P. aciculare</i> metode 20:50 kecepatan alir 2 mL/menit λ 254 nm selama 35 menit	33
Gambar 4.4 Kromatogram optimasi fraksi liken <i>P. aciculare</i> metode 20:50 kecepatan alir 2 mL/menit λ 254 nm selama 35 menit	34
Gambar 4.5 Kristal senyawa mayor liken <i>P. aciculare</i>	35
Gambar 4.6 Kromatogram hasil uji kemurnian isolasi senyawa mayor liken <i>P. aciculare</i> metode 20:50 λ 254 nm selama 35 menit	36
Gambar 4.7 Spektra $^1\text{H-NMR}$ senyawa mayor liken <i>P. aciculare</i> pelarut aseton dengan frekuensi 500 MHz	37
Gambar 4.8 Spektra gHSQC senyawa mayor <i>P. aciculare</i>	38
Gambar 4.9 Spektra $^{13}\text{C-NMR}$ senyawa mayor liken <i>P. aciculare</i> pelarut aseton dengan frekuensi 125 MHz (A), Spektra APT senyawa mayor liken <i>P. aciculare</i> pelarut aseton dengan frekuensi 125 MHz (B).....	39
Gambar 4.10 Spektra gHMBC senyawa mayor liken <i>P. aciculare</i>	40
Gambar 4.11 Proses penyusunan struktur molekul senyawa mayor <i>P.aciculare</i> berdasarkan analisis spektra NMR.....	41
Gambar 4.12 Korelasi proton-karbon (gHMBC) senyawa mayor <i>P. aciculare</i> ...	42

Gambar 4.13 Data LRMS liken senyawa major dari *P. aciculare*..... 44
Gambar 4.14 methyl 2,4-dihydroxy-3,6-dimethylbenzoate..... 45



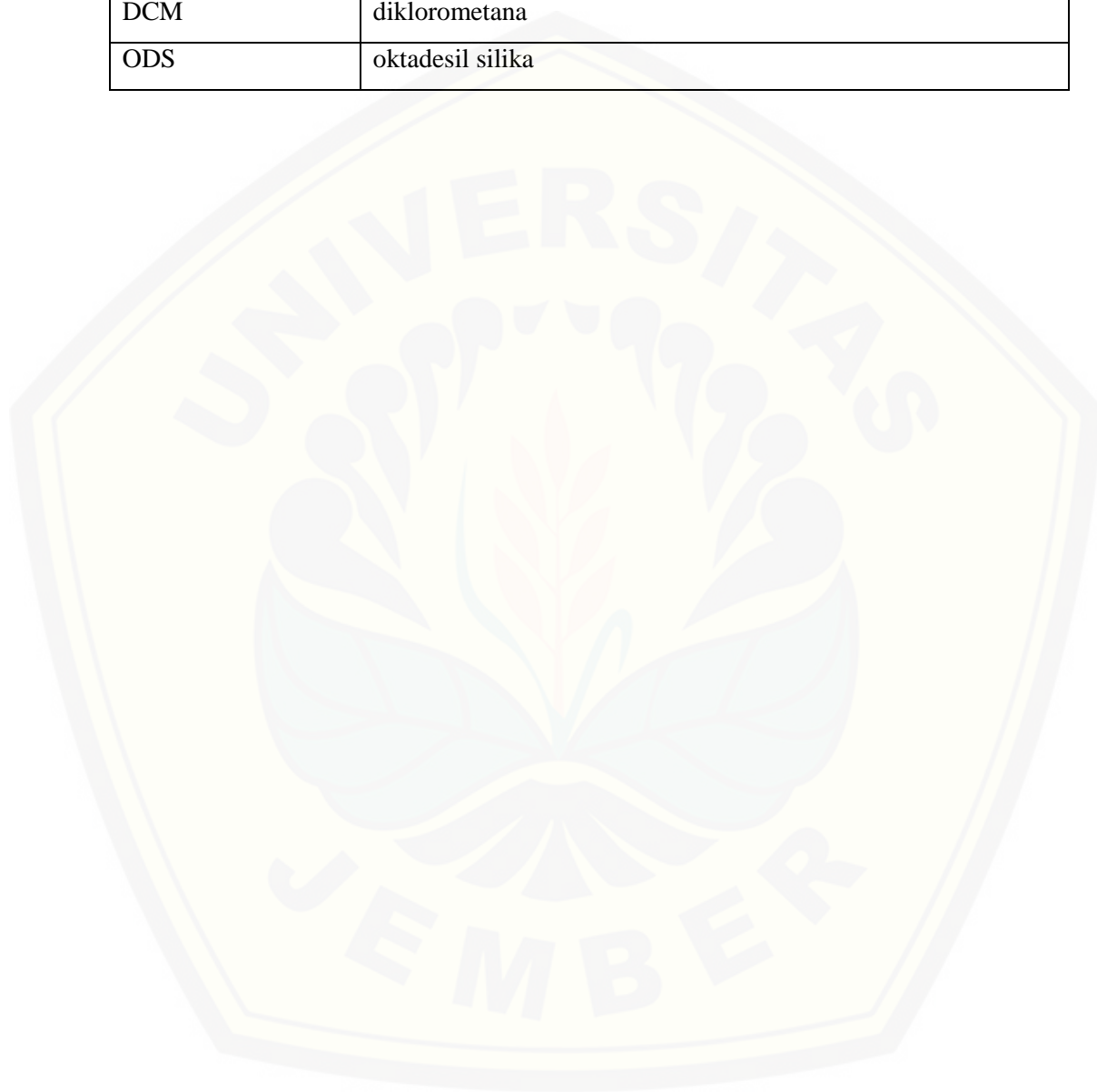
DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Perhitungan Pembuatan Ekstraksi	58
Lampiran 2	Perhitungan Pembuatan Fraksinasi.....	58
Lampiran 3	Perhitungan Konsentrasi Gentamisin Uji Antibakteri.....	58
Lampiran 4	Perhitungan Media CAMHB	59
Lampiran 5	Perhitungan Konsentrasi Ekstrak Uji Aktivitas Antibakteri.....	60
Lampiran 6	Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Metode Mikrodilusi Konsentrasi Tunggal	61
Lampiran 7	Perhitungan Uji Antibakteri.....	62
Lampiran 8	Analisis Data Hasil Uji Aktivitas Antibakteri	63
Lampiran 9	Data <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (NMR).....	64
Lampiran 10	Data <i>Mass Spectroscopy</i> (MS)	64
Lampiran 11	ChemDraw Prediksi NMR	65

TABEL ABREVIASI

Abreviasi	Definisi
HPLC	<i>High Pressure Liquid Column</i>
ESI-MS	<i>Electrospray Ionization – Mass Spectrometry</i>
LRMS	<i>Low Resolution Mass Spectrometry</i>
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
¹ H-NMR	<i>Hydrogen-1 Nuclear Magnetic Resonance</i>
¹³ C-NMR	<i>Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance</i>
gCOSY	<i>Correlated Spectroscopy</i>
gHSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
gHMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
Uv-Vis	<i>Ultraviolet-Visible</i>
mg/L	milligram per liter
μL	mikroliter
μm	mikrometer
CFU/mL	<i>Colony Forming Unit per mililiter</i>
λ	lambda / panjang gelombang
δ	Muatan parsial
m/z	<i>mass to charge</i>
a.m.u.	<i>atomic mass unit</i>
J	<i>joule (kg m² s⁻²)</i>
Hz	<i>hertz</i>
CV	<i>Coefficient of Variation</i>
MHA	<i>Mueller Hinton Agar</i>
MHB	<i>Mueller Hinton Broth</i>
CAMHB	<i>Cation Adjusted Mueller Hinton Broth</i>
MgCl ₂	magnesium klorida
CaCl ₂	kalsium klorida
Mg ²⁺	ion magnesium
Ca ²⁺	ion kalsium
NaCl	natrium klorida

BaCl ₂	barium klorida
H ₂ SO ₄	asam sulfat
CD ₃ OD	aseton terdeprotonasi
DMSO	dimetil sulfoksida
DCM	diklorometana
ODS	oktadesil silika



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Menurut *World Health Organization* (WHO), penyakit infeksi merupakan penyakit menular secara langsung maupun tidak langsung yang disebabkan oleh mikroorganisme patogen, seperti bakteri, virus, jamur ataupun parasit (WHO, 2016a). Penyakit infeksi dapat menyerang siapa saja termasuk anak-anak maupun balita. Setiap tahunnya sekitar 9 juta orang meninggal dan mengalami cacat seumur hidup karena penyakit infeksi (TDS, 2012). Berdasarkan data WHO (2016b), penyakit infeksi masuk ke dalam 10 besar penyebab kematian di dunia. Penyakit infeksi saluran napas bagian bawah menduduki peringkat ketiga penyebab kematian di dunia dengan 3 juta kematian. Terdapat juga penyakit infeksi diare dengan 1,4 juta kematian dan tuberkulosis dengan 1,3 juta kematian. Penyakit infeksi mudah terjadi di negara berkembang termasuk Indonesia. Berdasarkan data prevalensi penyakit menular di Indonesia antara lain infeksi saluran pernapasan atas (ISPA) 25%, tuberkulosis 44,4%, pneumonia 4,5%, hepatitis 1,2%, diare 7%, dan malaria 1,9% (Kementerian Kesehatan RI, 2013).

Penyakit infeksi dapat disebabkan oleh bakteri patogen (Wells dkk., 2017). Salah satu contoh bakteri patogen adalah *Staphylococcus aureus*. *S. aureus* dapat menyebabkan berbagai infeksi seperti infeksi kulit dan jaringan lunak ataupun pneumonia yang berupa infeksi komunitas dan nosokomial (Horino dan Hori, 2019). Pengobatan penyakit infeksi ini dapat dengan diberikan antibiotik.

Saat ini telah terjadi resistensi antibiotik secara meluas yang meningkatkan permasalahan kesehatan di dunia. Resistensi antibiotik merupakan keadaan bakteri tahan dengan antibiotik yang telah teridentifikasi (Bax dkk., 2000; Chandra Mohana dkk., 2018). Hal tersebut disebabkan penggunaan berlebihan dan penyalahgunaan antibiotik pada manusia maupun hewan sehingga perlu dilakukan penemuan serta pengembangan antibiotik baru (Hashemi dkk., 2013; WHO, 2019). Resistensi antibiotik secara cepat terjadi pada patogen *S. aureus* (Tanaka

dkk., 2006). Lebih dari 95% pasien karena infeksi *Staphylococcus aureus* di dunia tidak merespon terhadap lini pertama antibiotik seperti penisilin (Gillaspy dkk., 2015). Kasus resistensi bakteri *S. aureus* bermula dari *S. aureus* rentan terhadap penisilin tetapi lebih mendominasi strain yang menghasilkan β -laktamase yang dapat memecah cincin β -laktam pada penisilin. Kemudian ditemukan metisilin sebagai antibiotik *S. aureus* dengan strain sensitif. Resistensi kembali terjadi yaitu *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* atau yang sering disebut MRSA (Irianto, 2014).

Penemuan antibiotik telah dikembangkan hingga saat ini dan terdapat lebih dari 100 jenis antibiotik (Nigam dkk., 2014). Banyak obat yang digunakan dewasa ini 40% berasal dari bahan alam. Terdapat sekitar 75% obat infeksi berasal dari bahan alam ataupun derivatnya (Samuelsson dkk., 2009). Penemuan obat infeksi pertama yaitu penisilin juga bersumber dari *Penicillium chrysogenum* yang merupakan golongan kingdom fungi (jamur). Dalam penemuan jamur sebagai sumber antibiotik, pada tahun 1940-an liken mulai diteliti aktivitasnya.

Liken merupakan hasil simbiosis mutualisme antara jamur dengan alga (Adnani dkk., 2017). Salah satu penelitian terdahulu oleh Burkholder dkk. (1944) menyatakan bahwa 27 dari 42 ekstrak liken yang berbeda mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan atau *Bacillus subtilis*. Hal tersebut didukung beberapa penelitian menyebutkan bahwa liken mempunyai aktivitas antibakteri (Basile dkk., 2015; Felczykowska dkk., 2017; Resende dkk., 2018)

Terdapat sekitar 20.000 spesies liken telah teridentifikasi tersebar dari daerah Artik hingga daerah tropis dan sekitar 100.000 liken belum teridentifikasi di dunia (Negi, 2003). Di Indonesia, liken sangat mudah tumbuh dan ditemukan. Keadaan iklim dan geografis Indonesia yang kaya akan biodiversitas berpotensi sebagai bahan awal untuk obat baru (Maulidiyah dkk., 2018). Biodiversitas Indonesia merupakan biodiversitas terbesar kedua di dunia dengan 40.000 tumbuhan spesies endemik termasuk 6.000 diantaranya tanaman obat (Nugraha dan Keller, 2011). Terdapat banyak spesies liken yang belum teridentifikasi dan hingga saat ini penelitian terkait liken di Indonesia sangat terbatas (Kranner dkk.,

2008; Ari S. Nugraha dkk., 2019; Ari Satia Nugraha dkk., 2019; Nugraha dkk., 2020).

Liken menghasilkan metabolit sekunder yang digunakan untuk bertahan hidup pada lingkungan yang panas, dingin, maupun kering dan melindungi dirinya dari kompetitor ataupun predator. Menurut Molnár and Farkas (2010), terdapat 1050 metabolit sekunder liken dan beberapa telah diuji memiliki bioaktivitas sebagai antibakteri, antiprotozoa, antioksidan, antiproliferatif, dan antikanker (Shrestha dan St. Clair, 2013).

Pada penelitian ini sampel yang digunakan adalah liken *Phyloporon aciculare*. Morfologi liken *P. aciculare* termasuk dalam fruktiose yang mempunyai biomassa yang cukup banyak sehingga memudahkan dalam pengambilan sampel. Liken *P. aciculare* termasuk dalam famili Cladoniacea. Berdasarkan penelitian Samuelsson dan Bohlin (2017), liken *Cladonia verticillaris* yang termasuk dalam famili Cladoniacea memiliki aktivitas antibakteri. Hal tersebut memungkinkan liken *P. aciculare* juga memiliki aktivitas antibakteri. Dewasa ini belum terdapat penelitian tentang liken *P. aciculare*.

Berdasarkan uraian di atas, untuk mengetahui metabolit sekunder liken yang aktif antibakteri maka perlu dilakukan isolasi dan karakterisasi senyawa terkandung dalam liken *Phyloporon aciculare* (Ach.) Nyl serta uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Penelitian ini diharapkan dapat menjadi referensi penelitian dan pengembangan antibiotik serta menambah informasi biodiversitas liken Indonesia. Senyawa liken akan diisolasi menggunakan HPLC kemudian senyawa isolat dikarakterisasi dengan *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR) yang menggunakan data inti dari ^1H dan ^{13}C untuk mengetahui spektrum senyawa metabolit sekunder sampel yang selanjutnya dianalisis untuk mendapatkan struktur isolat dari sampel yang kemudian di konfirmasi menggunakan *Electrospray Ionization Mass Spectrometry* (ESI-MS). Uji aktivitas antibakteri akan dilakukan dengan metode mikrodilusi yang menggunakan konsentrasi tunggal.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian di atas, masalah yang dapat dirumuskan pada penelitian ini antara lain sebagai berikut.

1. Apakah kandungan senyawa utama berdasarkan hasil karakterisasi dari isolat tumbuhan liken *Phyloporon aciculare* (Ach.) Nyl?
2. Berapakah persentase penghambatan aktivitas antibakteri fraksi liken *Phyloporon aciculare* (Ach.) Nyl terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*?

1.3 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan yang ingin dicapai dalam penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Mengetahui senyawa utama metabolit sekunder liken *Phyloporon aciculare* (Ach.) Nyl.
2. Mengetahui apakah liken *Phyloporon aciculare* (Ach.) Nyl memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*.

1.4 Manfaat Penelitian

Adapun manfaat yang ingin didapat dari penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi kepada penelitian selanjutnya antibakteri bahan alam utamanya liken.
2. Menggali informasi liken di Indonesia untuk keberlanjutan IPTEK dan kemajuan pengembangan obat bahan alam di Indonesia.

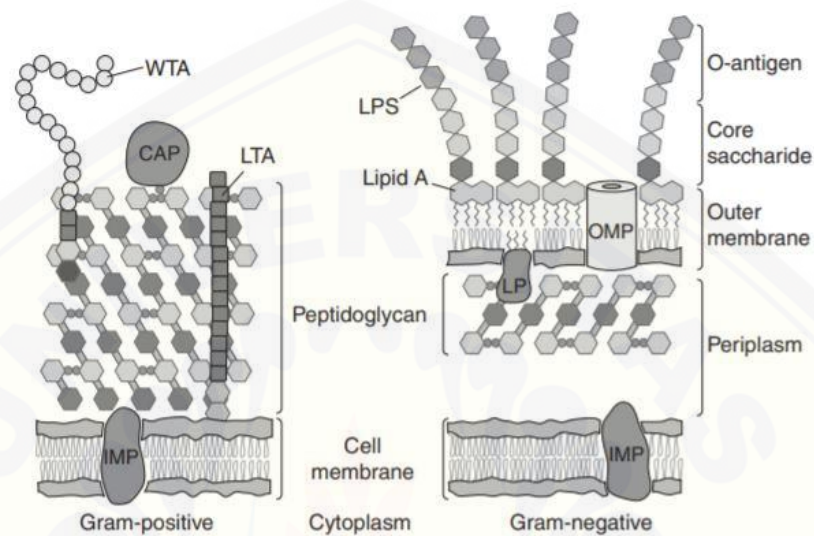
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Penyakit Infeksi

Penyakit infeksi merupakan penyakit menular secara langsung maupun tidak langsung yang disebabkan oleh mikroorganisme patogen, seperti bakteri, virus, jamur ataupun parasit (WHO, 2016). Penyakit infeksi dapat menyerang siapa saja termasuk anak-anak maupun balita. Setiap tahunnya sekitar 9 juta orang meninggal dan mengalami cacat seumur hidup karena penyakit infeksi (TDS, 2012). Berdasarkan data WHO (2018), penyakit infeksi masuk ke dalam 10 besar penyebab kematian di dunia. Penyakit infeksi saluran napas bagian bawah menduduki peringkat ketiga penyebab kematian di dunia dengan 3 juta kematian. Terdapat juga penyakit infeksi diare dengan 1,4 juta kematian dan tuberkulosis dengan 1,3 juta kematian. Penyakit infeksi mudah terjadi di negara berkembang termasuk Indonesia. Berdasarkan data Kemenkes RI (2013), prevalensi penyakit menular di Indonesia antara lain infeksi saluran pernapasan atas (ISPA) 25%, tuberkulosis 44,4%, pneumonia 4,5%, hepatitis 1,2%, diare 7%, dan malaria 1,9%.

Salah satu penyebab penyakit infeksi adalah bakteri. Bakteri diklasifikasikan menjadi flora normal dan patogen. Flora normal merupakan mikroorganisme, bakteri, yang secara normal dengan jumlah tertentu berada di bagian tubuh dan tidak menimbulkan penyakit. Berbeda halnya dengan bakteri patogen yang keberadaannya pada tubuh dapat merugikan makhluk hidup. Berdasarkan morfologi dinding sel, bakteri dibagi menjadi bakteri gram positif dan bakteri gram negatif. Bakteri gram negatif pada dinding luar selnya terdapat lipopolisakarida (LPS) seperti bakteri *Bacteroides fragile*, *Escherichia coli*, *Gardnerella vaginalis*, *Haemophilus influenza*, *Neisseria meningitides*, dan *Neisseria gonorrhoeae*. Lipopolisakarida (LPS) pada permukaan membran dinding sel bakteri negatif merupakan endotoksin yang akan terlepas apabila bakteri mengalami lisis bakteri gram positif dinding selnya terdiri dari peptidoglikan yang lebih tebal dari bakteri gram negatif. Peptidoglikan berfungsi

menjaga bentuk dan integritas sel. Contoh bakteri gram positif antara lain bakteri *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Clostridium perfringens*, dan *Clostridium difficile*. (Gambar 2.1) (Silhavy dkk., 2010).

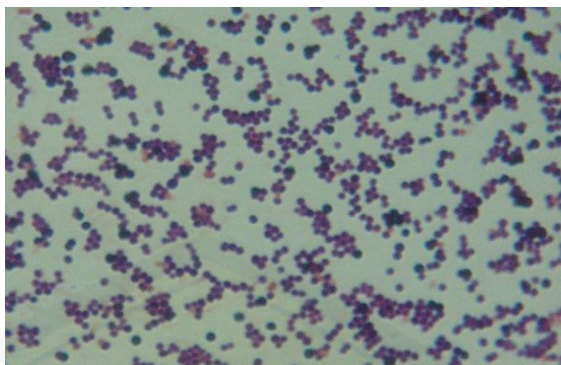


Gambar 2.1 Struktur bakteri gram positif dan negatif (Silhavy, 2010)

2.2 *Staphylococcus aureus*

Berikut adalah taksonomi dari *Staphylococcus aureus* (Gambar 2.2) (VetBact.org, 2018):

Filum	: Firmicutes
Kelas	: Bacilli
Ordo	: Bacillales
Famili	: Staphylococcaceae
Genus	: <i>Staphylococcus</i>
Spesies	: <i>Staphylococcus aureus</i>
Sub-spesies	: aureus



Gambar 2.2 *Staphylococcus aureus* (VetBact.org, 2018)

Staphylococcus aureus merupakan bakteri patogen gram positif yang berbentuk *coccus* (bulat) yang umumnya berdiameter sekitar 1 μm . *S. aureus* berasal dari kata *staphyle* yang berarti seikat anggur dan *aureus* yang berarti emas. Sel *S. aureus* dapat membelah lebih dari satu bidang untuk membentuk koloni yang berbentuk tidak beraturan seperti anggur. Koloni *S. aureus* sering memiliki berwarna kuning keemasan (*aureus*) di banyak media terutama pada inkubasi yang berkepanjangan. *S. aureus* merupakan bakteri mesofil yang tumbuh secara optimal sekitar 37°C dan pada kisaran suhu dari 7°C hingga 48°C. Umumnya bakteri *S. aureus* tumbuh pada pH netral (6-7) tetapi dapat tumbuh juga pada pH 4 dan pH 10 walaupun pertumbuhannya akan jauh lebih lambat (Adams, 2009). Bakteri patogen *S. aureus* dapat menghasilkan enzim koagulase yang berfungsi sebagai katalisator perubahan fibrinogen menjadi fibrin yang menjadi proteksi diri bagi bakteri. Selain itu, bakteri *S. aureus* mempunyai reseptor terhadap permukaan sel inang dan protein matriks seperti kolagen yang membantu bakteri melekat pada sel inang. Bakteri *S. aureus* juga menghasilkan enzim link ekstraseluler seperti lipase yang membantu invasi dengan memecah jaringan inang. Hal tersebut menyebabkan bakteri *S.aureus* mudah menginfeksi (Irianto, 2014).

Flora normal *S. aureus* sebanyak kurang lebih 40% dapat ditemukan pada bagian tubuh orang sehat seperti kulit, ketiak, hidung, atau perineum. Penyebaran bakteri *S. aureus* dapat melalui udara ataupun kontak langsung dengan orang yang terinfeksi. *Staphylococcus aureus* menyebabkan berbagai infeksi dengan rentang

sindrom yang luas seperti infeksi kulit dan jaringan lunak ataupun pneumonia yang berupa infeksi komunitas dan nosokomial (Horino dan Hori, 2019).

2.3 Antibakteri

Sebelum awal abad ke-20, penggunaan obat untuk penyakit infeksi utamanya didasarkan pada cerita rakyat (Yanling dkk., 2013). Menurut Bansal dan Jain tahun 2014, penggunaan obat infeksi dengan sifat antimikroba telah digunakan lebih dari 2000 tahun yang lalu. Bahkan manusia prasejarah menggunakan sejumlah tanaman dalam perawatan luka diduga mempunyai antimikroba (Forrest, 1982; Ge dkk., 2013).

Penemuan penisilin tahun 1928 membuka jendela baru pengobatan penyakit infeksi karena bakteri. Penemuan antibiotik telah dikembangkan hingga saat ini dan terdapat lebih dari 100 jenis antibiotik (Nigam dkk., 2014). Antibakteri diklasifikasikan berdasarkan mekanisme aksi atau spektrum aktivitasnya. Kelas utama obat antibakteri hanya menargetkan pada empat fungsi bakteri klasik antara lain biosintesis dinding sel bakteri contohnya penisilin dan vankomisin; biosintesis protein bakteri contohnya aminoglikosida dan makrolida; Replikasi DNA dan RNA contohnya ciprofloxacina dan rifampin; dan biosintesis koenzim folat contohnya sulfametoksazol (Yanling dkk., 2013).

Banyak obat yang digunakan dewasa ini 40% berasal dari bahan alam. Terdapat sekitar 75% obat infeksi berasal dari bahan alam ataupun derivatnya (Samuelsson dkk., 2009). Penemuan obat infeksi pertama yaitu penisilin juga bersumber dari *Penicillium chrysogenum* yang merupakan golongan kingdom fungi (jamur). Dalam penemuan jamur sebagai sumber antibiotik, pada tahun 1940-an liken mulai diteliti aktivitasnya.

2.4 Liken

Taksonomi liken *Phyloporon aciculare* (Ach.) Nyl (Gambar 2.3) berdasarkan ITIS (1996) adalah sebagai berikut.

Kingdom	: Fungi
Subkingdom	: Dikarya
Divisi	: Ascomycota
Subdivisi	: Pezizomycotina
Kelas	: Lecanoromycetes
Subkelas	: Lecanoromycetidae
Ordo	: Lecanorales
Famili	: Cladoniaceae
Genus	: Pilophorus
Spesies	: <i>Philoporus acicularis</i>

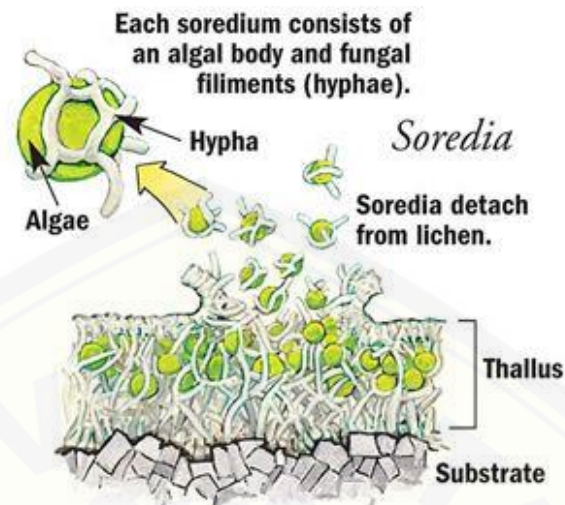


(A)

(B)

Gambar 2.3 Liken *P. aciculare* Mutch 2017 (A), Dokumentasi pribadi (B)

Liken merupakan tanaman pionir dan juga merupakan tanaman yang paling sederhana karena tidak memiliki organ khusus seperti akar, tunas maupun daun. Hal ini memungkinkan liken dapat hidup dilingkungan yang ekstrim (Negi, 2003). Liken atau jamur kerak, termasuk dalam kingdom *fungi* tidak dapat menghasilkan makanan sendiri dan umumnya menjadi parasit atau dekomposer.



Gambar 2.4 Simbiosis jamur dengan alga (PlantScience4U.com, 2014)

Liken terbentuk karena simbiosis mutualisme antara jamur dan alga atau sianobakteri (Gambar 2.4) (Adnani dkk., 2017). Liken sebagai mikobion memiliki dua peran utama dalam simbiosis yakni menjadi tempat hidup fotobion (alga) yang dapat melindungi dari paparan sinar matahari (radiasi ultraviolet) dan menyerap nutrisi mineral dari permukaan untuk menghindari kekeringan. Fotobion berperan untuk menyediakan makanan bagi mikobion dengan memberikan 60% hasil fotosintesis, dalam kasus sianobakteria, untuk menghasilkan ammonium (dan kemudian senyawa nitrogen organik) dari gas N_2 , dengan nitrogen terfiksasi (Ranković dan Kosanić, 2015).



(A)

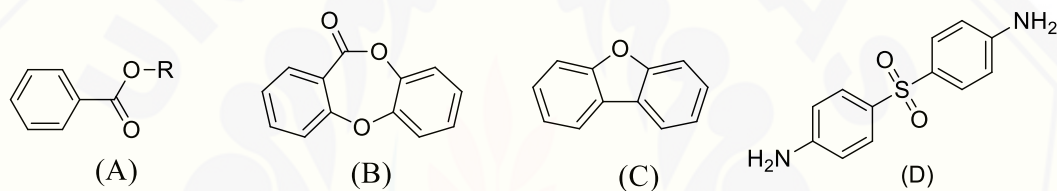
(B)

(C)

Gambar 2.5 Morfologi liken tipe Krustose (A), Foliose (B), Fruktiose (C)

Terdapat 3 bentuk morfologi liken yaitu liken krustose, foliose, dan fruktiose (Gambar 2.5) (Pratiwi, 2008). Menurut Roziaty (2016), liken krustose merupakan lumut kerak yang memiliki talus yang berukuran kecil, datar, tipis, dan selalu melekat pada permukaan substrat. Berbeda dengan liken foliose yang memiliki struktur seperti daun yang tersusun oleh beberapa lobus dan relatif melekat lebih longgar pada substratnya. Pada liken fruktiose, talusnya seperti semak dan memiliki banyak cabang. Talus liken fruktiose tumbuh tegak atau menggantung pada substrat.

2.4.1 Metabolit Sekunder Liken



Gambar 2.6 Beberapa struktur metabolit sekunder liken yaitu Depside (A), Depsidone (B), Dibenzofuran (C), Depsone (D)

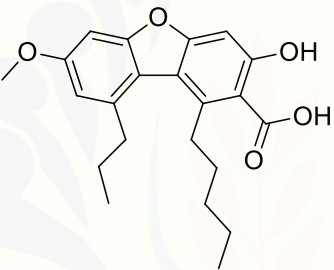
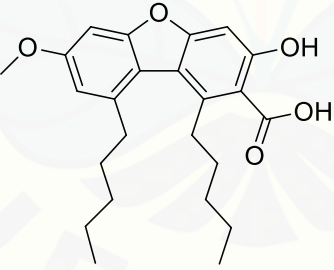
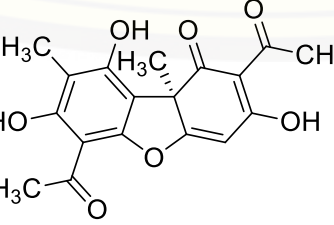
Liken menghasilkan metabolit sekunder yang digunakan untuk bertahan hidup pada lingkungan yang panas, dingin, maupun kering dan melindungi dirinya dari kompetitor ataupun predator. Menurut Ranković dan Kosanić tahun 2015, umumnya golongan senyawa liken yang memiliki aktivitas antimikroba utamanya sebagai antibakteri adalah asam usnik, fenolik, triterpen, steroid, antrakuinon, depside, depsidone, dan dapsone. Senyawa golongan depside, depsidone, dibenzofurane dan depsone merupakan metabolit sekunder unik yang terdapat pada liken (Yuan, 2010) (Gambar 2.6).

2.4.2 Aktivitas Antibakteri Liken

Menurut Molnár and Farkas (2010), terdapat 1050 metabolit sekunder liken dan beberapa telah diuji memiliki bioaktivitas sebagai antibakteri, antiprotozoa, antioksidan, antiproliferatif, dan antikanker. Berikut penelitian

terkait aktivitas metabolit sekunder liken, diantaranya antikanker (Aravind dkk., 2014; Suh dkk., 2017), antiproliferatif (Bucar dkk., 2004; Burlando dkk., 2009; Brisdelli dkk., 2013; Bessadóttir dkk., 2014), antioksidan (Bhattarai dkk., 2008) dan antibakteri (Burkholder dkk., 1944; Gulluce dkk., 2006; Yuan, 2010; Shrestha dan St. Clair, 2013; Basile dkk., 2015; Felczykowska dkk., 2017; Resende dkk., 2018). Berikut aktivitas metabolit liken famili Cladoniacea sebagai antibakteri (Tabel 2.1).

Tabel 2.1 Berbagai penelitian antibakteri terhadap liken famili Cladoniacea

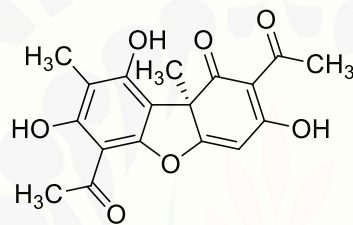
Liken	Metabolit Sekunder	Aktivitas
<i>Cladonia incrassata</i>	<p><i>didymic acid</i></p> 	Aktif terhadap <i>S. aureus</i> dengan MIC 7,5µg/ml (Dieu dkk., 2014).
	<p><i>condidymic acid</i></p> 	
	<p>(-)-<i>usnic acid</i></p> 	
<i>Cladonia</i>	<i>Lectins</i>	Aktif terhadap bakteri gram

verticillaris

positif (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, dan *Enterococcus faecalis*) dan bakteri gram negatif (*Escherichia coli* dan *Klebsiella pneumoniae*) dengan penghambatan paling baik pada bakteri *E. coli* (MIC of 7.18 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Ramos dkk., 2014)

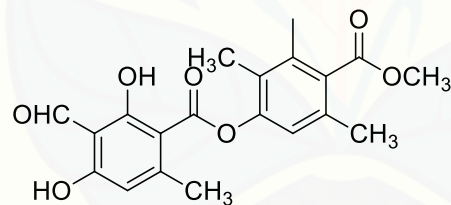
Cladonia foliacea

(-)-usnic acid

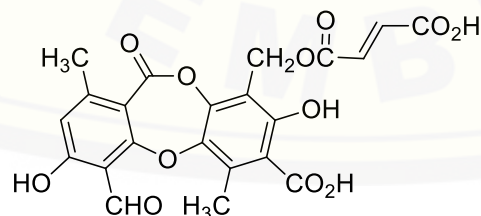


Aktif terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris*, *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus faecalis*, dan *Listeria monocytogenes* serta jamur *Candida albicans* dan *Candida glabrata* (Yilmaz dkk., 2004)

Atranorin



fumarprotocetraric acid



2.5 Ekstraksi, Fraksinasi dan Isolasi

2.5.1 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses pemisahan komponen kimia dari tumbuhan ataupun hewan berfungsi untuk menarik analit dari sampel dengan pelarut yang tepat (Mandal dkk., 2015). Prinsip metode ekstraksi berdasarkan *like dissolve like* yaitu semakin larut analit dalam pelarut maka ekstraksi semakin baik. Kecepatan difusi pada ekstraksi dipengaruhi beberapa faktor antara lain temperatur, luas permukaan partikel analit, jenis pelarut, perbandingan analit dengan pelarut serta kecepatan dan lama pengadukan.

Ekstraksi bahan alam umumnya menggunakan metode maserasi, perkolasi, refluks, sohletasi, digesti, infus, dan dekok. Metode ekstraksi padat cair dibedakan menjadi metode maserasi, perkolasi, dan sohletasi. Menurut Leba (2017), metode maserasi merupakan metode ekstraksi yang sederhana karena cara dan alat yang dibutuhkan dalam ekstraksi mudah. Metode maserasi merupakan proses ekstraksi dengan merendam analit dalam pelarut yang tepat pada suhu ruang. Proses perendaman sekitar 3-5 hari dengan diaduk sesekali dan dapat dilakukan secara berulang (remaserasi). Parameter analit telah terekstrak sempurna dengan warna pelarut yang menjadi jernih setelah analit dan pelarut tercampur.

2.5.2 Fraksinasi

Fraksinasi merupakan proses untuk memisahkan senyawa ekstrak sesuai sifat fisika kimia. Metode fraksinasi secara umum dapat dilakukan dengan metode partisi cair-cair, pengendapan, destilasi, dan kromatografi. Metode partisi cair-cair merupakan metode dengan menambahkan cairan dalam ekstrak yang telah dilarutkan dalam cairan lain yang tidak bercampur sehingga membentuk dua fase. Senyawa dalam ekstrak akan melarut di antara dua fase tersebut sesuai polaritasnya. Prinsip metode ini berdasarkan *like dissolve like* sehingga kelarutan senyawa antar dua fase akan tergantung kemiripan antara polaritas senyawa dengan cairan pelarut (Houghton dan Raman, 2012).

2.5.3 Isolasi

Isolasi merupakan proses pemisahan suatu senyawa dari komponen senyawa untuk mendapatkan isolat murni. Isolasi dapat dilakukan dengan beberapa metode antara lain *Thin Layer Chromatography* (TLC), *Low Pressure Column Chromatography* (LPLC), *High Pressure Column Chromatography* (HPLC), *Ion Exchange Chromatography* (IEC), dan *Countercurrent Chromatography* (CCC) (Sarker, 2012).

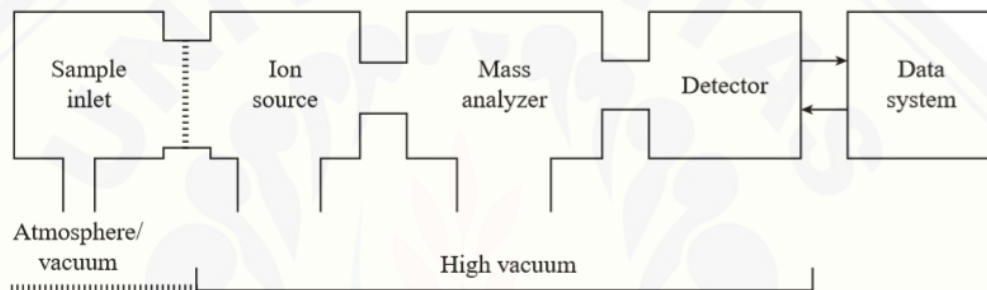
HPLC merupakan metode pemisahan molekul berdasarkan polaritas dengan tekanan yang tinggi. Pada penelitian ini digunakan Preparatif-HPLC (prep-HPLC) dapat digunakan untuk pemisahan maupun isolasi bahan alam karena mempunyai kolom yang besar, *loading* sampel yang besar dan laju alir yang tinggi sehingga mendapatkan kuantitas yang banyak dalam pemurnian maupun isolasi (Sarker, 2012). Terdapat beberapa tipe prep-HPLC dalam pemurnian bahan alam antara lain *normal phase*, *reversed-phase*, *gel permeation chromatography* (GPC), dan *ion exchange chromatography*. Tipe prep-HPLC dipilih tergantung dari karakteristik dari komabilitas ekstrak yang akan digunakan. Pada penelitian ini digunakan *reversed-phase* yang fase diamnya bersifat nonpolar dari pada eluennya (Sarker, 2012).

Eluen yang digunakan pada prep-HPLC harus memenuhi beberapa kriteria anatara lain mempunyai kemurnian yang tinggi, kompatibel dengan detektor dan tidak mengganggu observasi dari komponen target, kekentalan yang rendah untuk menjaga tekanan tetap rendah, dan harga yang terjangkau. Gas yang terkandung dalam eluen harus dihilangkan (degaser) untuk menghilangkan oksigen yang dapat membuat mikroskopik gelembung pada saat tekanan tinggi. Gelembung udara ini dapat mengganggu pembacaan dari detektor. Eluen perlu diultrasonik sebelum digunakan. Eluen yang dapat digunakan pada *reversed-phased* prep-HPLC umumnya gabungan air dan larut dalam pelarut organik seperti asetonitril (ACN), metanol (MeOH), atau *tetrahydrofuran* (THF) (Sarker, 2012).

2.6 Karakterisasi Senyawa

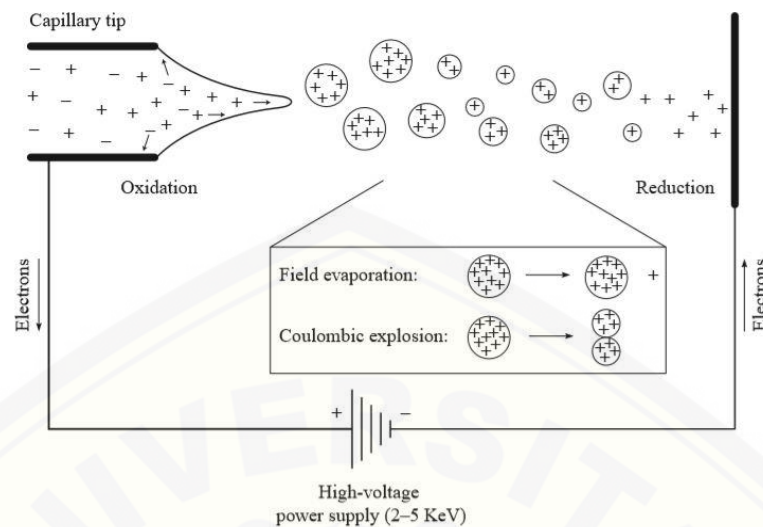
2.6.1 *Electrospray Ionization-Mass Spectrometry (ESI-MS)*

Spektrometer massa (MS) merupakan metode untuk menentukan massa atom atau molekul (m/z) dengan pembelokan partikel dalam medan magnet. Pada spektrometer massa atom atau molekul akan ditembak dengan elektron dengan kecepatan tinggi yang menyebabkan molekul akan melepaskan elektron. Jumlah elektron yang terlepas tersebut disebut nomor muatan (ion positif). *Mass-to-charge* (m/z) merupakan massa dibagi dengan nomor muatan.



Gambar 2.7 Komponen *Mass Spectrometry* (MS) (Pavia dkk., 2009)

Dalam *Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)*, aliran gas yang dari kromatografi gas dimasukkan ke dalam ruang ionisasi spektrometer massa. Spektrometer massa berperan dalam peran detector. Pada *High Chromatography-Mass Spectrometry (HPLC-MS, atau lebih sederhana LC-MS)* menggabungkan instrumen HPLC dan spektrometer massa. Zat yang elusi dari kolom HPLC dideteksi oleh spektrometer massa, dan spektra massanya dapat ditampilkan, dianalisis, dan dibandingkan dengan spektra standar yang telah ada di komputer instrumen (Gambar 2.7) (Pavia dkk., 2009).



Gambar 2.8 Mekanisme *Electrospray Ionization-Mass Spectrometry* (ESI-MS) (Pavia dkk., 2009)

Mekanisme metode ESI-MS yaitu larutan yang mengandung molekul sampel disemprotkan keluar ujung kapiler halus ke dalam ruang panas yang berada pada tekanan atmosfer yang hampir sama. Kapiler yang dilewati oleh larutan sampel memiliki potensi tegangan tinggi di permukaannya, dan tetesan kecil bermuatan dikeluarkan ke dalam ruang ionisasi. Tetesan bermuatan mengalami arus balik karena gas pengeringan (nitrogen) yang menguapkan molekul pelarut dari tetesan. Kerapatan muatan dari setiap tetesan meningkat hingga gaya tolak elektrostatis melebihi tegangan permukaan tetesan (batas Rayleigh) sehingga titik tetesan pecah menjadi tetesan yang lebih kecil. Proses ini berlanjut sampai ion sampel bebas pelarut dibiarkan dalam fase gas (Gambar 2.8) (Pavia dkk., 2009).

2.6.2 Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

Nuclear Magnetic Resonance (NMR) adalah metode spektroskopi yang baik untuk mengidentifikasi dan menganalisa senyawa organik. Metode tersebut didasarkan pada *spin* inti dari ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , dan ^{31}P . Secara umum, elucidasi struktur molekul organik menggunakan data spin inti dari ^1H dan ^{13}C . NMR dapat

memberikan informasi tentang jumlah atom yang berbeda secara magnetis (Balci, 2005).

Spektroskopi ^1H dan ^{13}C termasuk dalam 1D NMR karena hanya memiliki 2 yaitu sumbu frekuensi berupa pergeseran kimia (*chemical shift*) dalam ppm dan intensitas. Spektroskopi NMR ^1H untuk mengetahui susunan hidrogen molekul dari pergeseran kimia dan banyaknya sinyal sebagai identifikasi jenis ^1H molekul, luas puncak sebagai banyak inti ^1H , pola pembelahan spin sebagai jumlah ^1H tetangga terdekat yang dimiliki inti ^1H tertentu. Pada spektroskopi NMR ^{13}C dapat memberikan informasi tentang kerangka karbon (Hart dkk., 2003).

2D NMR mempunyai 3 sumbu yang sumbu pertama mewakili pergeseran kimia pertama, sumbu kedua mewakili rentang pergeseran kimia kedua, dan sumbu ketiga merupakan intensitas. 2D-NMR terdiri dari *Correlated Spectroscopy* (COSY), *Nuclear Overhauser Effect* (NOESY), *Heteronuclear Single-Quantum Correlation* (HSQC), dan *Heteronuclear multiple-bond correlation* (HMBC). COSY merupakan spektroskopi korelasi dari H-H yang digunakan untuk mengetahui proton-proton yang berdekatan pada suatu senyawa. NOESY untuk mengetahui hubungan proton dalam molekul yang berdekatan tetapi tidak terhubung oleh ikatan kimia. HSQC mendeteksi korelasi antara proton dengan karbon dalam satu ikatan. HMBC menunjukkan korelasi antara proton dengan karbon dalam jarak dua sampai tiga ikatan sehingga secara tidak langsung dapat diketahui konektivitas antar karbon dalam jarak tersebut (Balci, 2005).

2.7 Uji Aktivitas Antibakteri

Penelitian dan pengembangan agen antimikroba untuk menangani resistensi patogen beberapa tahun terakhir mengalami peningkatan yang cukup tinggi. Uji aktivitas dibagi menjadi difusi dan dilusi. Beberapa *bioassay* yang umum digunakan seperti disk-difusi, *well diffusion* dan dilusi *broth* atau agar (Balouiri dkk., 2016)

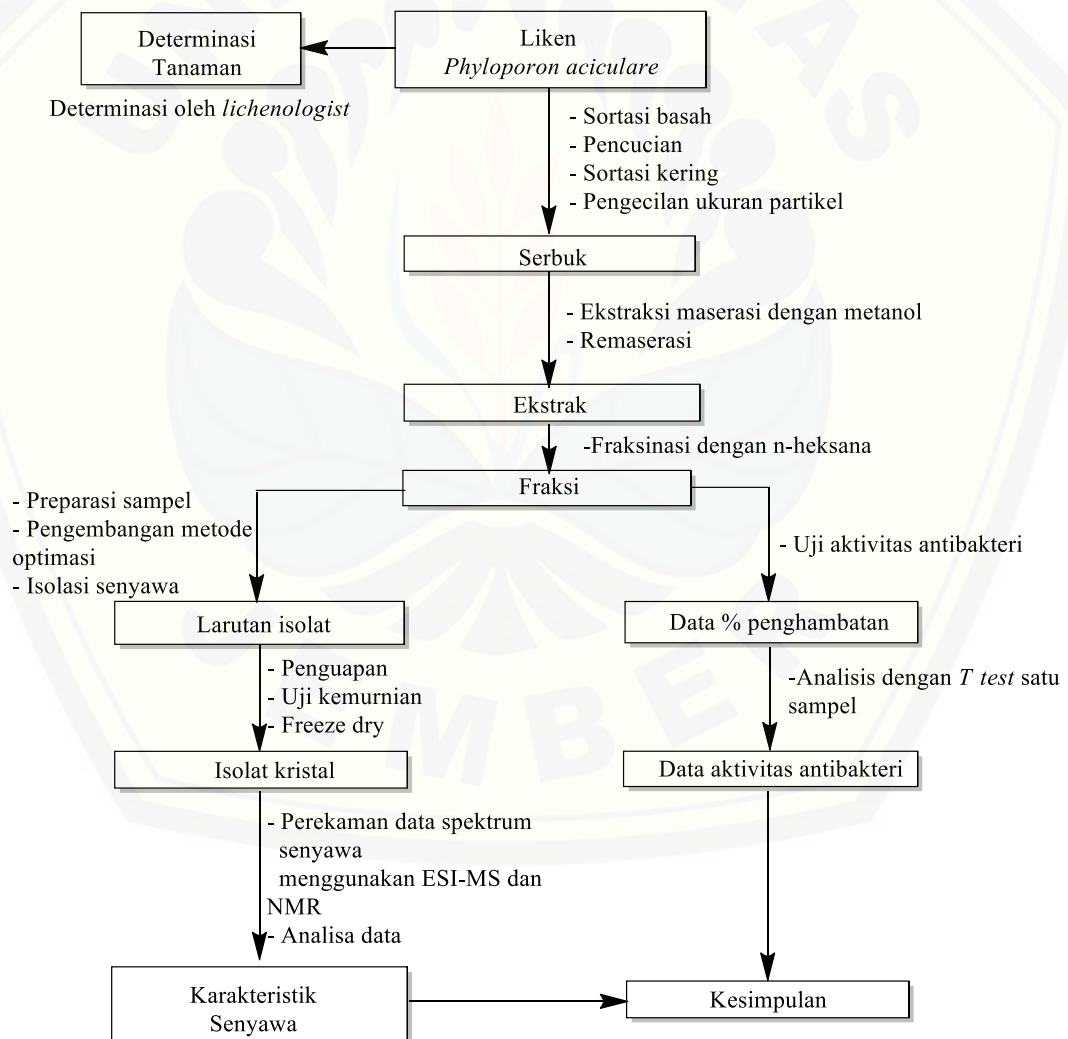
Uji difusi merupakan uji yang bersifat kualitatif sedangkan uji dilusi merupakan uji yang bersifat kuantitatif. Metode dilusi menunjukkan jumlah konsentrasi tertentu yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Data kuantitatif yang menunjukkan seberapa rentan suatu isolat, sistem pengujiannya mudah dipelajari dan dievaluasi serta standarisasi dalam uji coba antar laboratorium lebih mudah Uji aktivitas antibakteri pada penelitian ini digunakan mikrodilusi sesuai dengan protokol CLSI M07. Pada uji dilusi terdapat uji makrodilusi dan mikrodilusi. Mikrodilusi menggunakan sampel lebih sedikit untuk uji aktivitas dibandingkan dengan makrodilusi.. Keuntungan metode mikrodilusi adalah penggunaan sampel tidak terlalu banyak sehingga biaya uji aktivitas lebih ekonomis.

BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Liken *Phyloporon aciculare* (Ach.) Nyl serta Uji Antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ini merupakan penelitian *true experimental*.

3.2 Skema Penelitian



Gambar 3.1 Skema rancangan penelitian

3.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan mulai bulan September 2019 sampai Januari 2020 di Laboratorium Kimia Farmasi Universitas Jember dan Laboratorium *Center of Development of Advance Science and Technology* (CDAST) Universitas Jember, dan *University of Wollongong* Australia.

3.4 Alat dan Bahan

3.4.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain *beaker glass*, *erlenmeyer*, ayakan, timbangan analitik, blender (Phillips), spatula logam, mikrospatula logam, batang pengaduk, *magnetic stirrer* (UC152), corong, mangkuk, *ependorf*, vial, destilator, tabung reaksi (Pyrex), rak tabung reaksi, lemari pendingin, *syringe* 1 mL, *SGE* 100 μ L syringe (*Trajan Scientific and Medical*), *membrane filter* 0,45 μ l, pembakar spiritus, *orbital incubator* (Stuart SI600), *microplate flat bottom 96 wells* (Iwaki), mikropipet (Socorex dan Eppendorf), *12-channel micropipette* (Socorex), *petri dish*, spektrofotometer UV-Vis, *Laminar Air Flow* (THERMO CIENTIFIC SERIES A2), autoklaf (B-ONE), *hot plate* (UC152), vortex (GENIE2), *shacker inkubator* (B-ONE), *microplate reader*, perangkat lunak : IBM SPSS Statistic 22, *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) CECIL (detektor CECIL CE4300, degaser CE4040 dan pompa CE4104 yang dikendalikan oleh CE4900, perangkat lunak : PowerStream, kolom : Dispere M80 10x250 mm 4 μ m 80Å dan Symmetry C18 4,6x150 mm 5 μ m) , *Electrospray Ionization Mass Spectrometry* (ESI-MS) Shimadzu LC-2010 Mass Spectrometer, perangkat lunak : SeeMs, *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR) Bruker Avance 500 MHz, spektra 1D-NMR (^1H and ^{13}C NMR) dan spektra 2D-NMR (gCOSY, gHSQC, gHMBC, zTOCSY) direkam pada frekuensi 500 and 125 MHz, perangkat lunak : Mnova versi 14.1 dan perangkat lunak Chem Bio Draw versi 120.

3.4.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain liken *Phyloporon aciculare* (Ach.) Nyl, metanol pa, *n*-heksana, kertas saring, masker, *gloves*, aluminium foil, asetonitril pro analisis, *Steril Water For Injection (SWFI)*, aquades steril, *Mueller Hinton Agar (MHA)*, *Mueller Hinton Broth (MHB)*, infus NaCl 0,9%, BaCl₂, DMSO, etil asetat, H₂SO₄, gentamisin, alkohol 70%, dan CD₃OD.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak liken *Phyloporon aciculare* (Ach.) Nyl. Uji aktivitas antibakteri ekstrak metanol liken *Phyloporon aciculare* terhadap *Staphylococcus aureus* dengan konsentrasi 100µL/mL.

3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada uji aktivitas antibakteri adalah persen penghambatan sampel uji ekstrak liken *Phyloporon aciculare* terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dengan metode mikrodilusi.

3.5.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol penelitian ini adalah pembuatan serbuk liken *Phyloporon aciculare*, metode ekstraksi maserasi, metode isolasi, media MHA dan CAMHB, biakan bakteri, kondisi inkubasi, serta cara pengukuran hasil uji aktivitas antibakteri.

3.6 Definisi Operasional

Berikut adalah definisi operasional dari penelitian ini :

- a. Tumbuhan liken *Phyloporon aciculare* yang digunakan dalam penelitian ini liken yang melekat pada batu dan diambil secara acak dari Gunung Lawu, Sarangan, Kabupaten Magetan, Jawa Timur dengan letak geografis 7°39'51.1"S111°11'34.0"E.
- b. Isolasi senyawa liken *Phyloporon aciculare* menggunakan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) kolom Dispere M80 10x250mm 4µm 80Å dengan eluen gradien air (pompa A) dan asetonitril (pompa B) pada λ 254 nm selama 35 menit dengan laju alir 2 mL/menit.
- c. Karakterisasi senyawa liken *Phyloporon aciculare* dilakukan menggunakan *Electrospray Ionization Mass Spectrometry* (ESI-MS) Shimadzu LC-2010 Mass Spectrometer, *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR) Bruker Avance 500 MHz, spektra 1D-NMR (^1H and ^{13}C NMR) dan spektra 2D-NMR (gCOSY, gHSQC, gHMBC, zTOCSY) direkam pada frekuensi 500 and 125 MHz, dan *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR).
- d. Bakteri yang digunakan uji aktivitas antibakteri adalah *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Pengumpulan Sampel dan Determinasi Tanaman

Sampel tumbuhan liken *Phyloporon aciculare* diambil secara acak dari Gunung Lawu, Sarangan, Kabupaten Magetan, Jawa Timur dengan letak geografis 7°39'51.1"S111°11'34.0"E. Setelah itu, liken dideterminasi oleh *lichenogist* yaitu Ludmilla Fitri Untari, S.Si, M.Si di Fakultas Biologi Universitas Gajah Mada (UGM) Yogyakarta.

3.7.2 Pembuatan Simplisia

Sampel liken *Phyloporon aciculare* sebanyak 50 g yang telah dikumpulkan kemudian di sortasi basah dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan di suhu ruang. Selanjutnya sampel liken kembali di sortasi kering dan diblender untuk mengecilkan ukuran partikel liken menjadi serbuk kemudian diayak.

3.7.3 Ekstraksi

Serbuk liken *Phyloporon aciculare* ditimbang sebanyak 50 g dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer. Kemudian serbuk ditambahkan metanol 150 ml dan dimaserasi dengan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 200 rpm selama 24 jam pada suhu ruang. Hasil ekstraksi di saring dan residu ekstraksi di remaserasi dengan cara yang sama hingga pelarut menjadi jernih.

3.8 Pemisahan dan Pemurnian Metabolit Sekunder

3.8.1 Preparasi Sampel

Hasil ekstraksi ditimbang sebanyak 0,5 g kemudian ekstrak dilarutkan dalam *n*-heksana dan didiamkan hingga mengendap. Setelah itu, diambil bagian yang larut *n*-heksana dan dipindahkan ke vial dan dikeringkan hingga mengendap pada suhu ruang. Ulangi hingga ekstrak tidak larut *n*-heksana. Setelah sampel kering, ditimbang 50 g ekstrak dan dilarutkan dalam metanol 1 mL. Kemudian sampel diultrasonik selama 5 menit dan di disaring dengan *membrane filter* 0,45 μ L ke *ependorf* menggunakan *syringe* 1 mL.

3.8.2 Pengembangan Metode Isolasi

Sebelum dilakukan isolasi sampel dengan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) dengan detektor CECIL CE4300, degaser CE 4040 dan pompa CE 4104 yang dikendalikan oleh CE4900. Kolom yang digunakan adalah Dispere M80 10x250mm 4 μ m 80Å. Optimasi metode dilakukan dengan mengatur

gradien eluen. Eluen gradien terdiri dari *water for injection* (pompa A) dan asetonitril pro analisis (pompa B) pada λ 254 nm selama 35 menit dengan laju alir 2 mL/menit.

3.8.3 Isolasi Senyawa

Setelah menemukan kromatogram optimal dilakukan isolasi dengan injeksi 100 μ L sebanyak 30 kali injeksi terhadap metode optimal kromatogram dengan menampung larutan pada tabung reaksi. Tabung reaksi tersebut kemudian diuapkan di lemari asam hingga terbentuk kristal. Kemudian dilakukan uji kemurnian dengan menginjeksikan larutan isolat yang diuapkan. Selanjutnya dilakukan *freeze dry* terhadap isolat.

3.9 Perekaman Data Spektrum Senyawa

3.9.1 *Electrospray Ionization Mass Spectrometry* (ESI-MS)

Sampel liken *Phyloporon aciculare* dikirimkan ke *Wollongong University* Australia untuk diuji *Electrospray Ionization Mass Spectrometry* (ESI-MS). Sampel dilarutkan dalam metanol kemudian diinjeksikan ke dalam ESI-MS Shimadzu LC-2010 Mass Spectrometer. Data yang didapat dianalisis dengan aplikasi SeeMS.

3.9.2 *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR)

Isolat senyawa liken *Phyloporon aciculare* dikirimkan Universitas Wollongong Australia. Sampel ditimbang 10 mg kemudian dilarutkan dalam aseton ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$). Selanjutnya larutan diinjeksikan ke dalam NMR. Pengukuran dilakukan pada frekuensi resonansi 500 MHz pada $^1\text{H-NMR}$ dan 125 MHz pada $^{13}\text{C-NMR}$. Data yang didapatkan berupa data 1D-NMR ($^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$) dan 2D-NMR (gHSQC dan gHMBC) yang diinterpretasikan menggunakan aplikasi Mnova versi 14.1.

3.10 Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri pada penelitian ini mengacu pada protokol CLSI (2015) digunakan metode mikrodilusi dengan konsentrasi tunggal. Terdapat beberapa tahapan uji aktivitas pada penelitian ini antara lain sebagai berikut.

a. Sterilisasi Alat dan Bahan

Pada uji aktivitas antibakteri ini dilakukan secara aseptis. Peralatan yang digunakan seperti alat gelas, *yellow tip*, *blue tip*, dan media disterilisasi terlebih dahulu dengan autoklaf dengan suhu 121°C tekanan 1 MPa selama 15 menit.

b. Preparasi Media dan Larutan

1) Media MHA

Media *Mueller-Hinton Agar (MHA)* digunakan untuk peremajaan bakteri uji. Media dibuat dengan menimbang 1,6 g MHA dan melarutkannya dalam 80 mL akuades demineralisasi. Selanjutnya media disterilisasi yang kemudian dituang ke dalam cawan petri steril dengan volum sekitar 20 mL dan ditunggu memadat lalu disegel dengan parafilm.

2) Media CAMHB

Media CAMHB digunakan untuk uji aktivitas antibakteri dengan metode mikrodilusi. Media dibuat dengan menimbang 1,05 g Mueller Hinton Broth (MHB) dalam 50 mL akuades demineralisasi kemudian disterilisasi. Setelah itu, media ditambahkan dengan larutan $MgCl_2$ dan $CaCl_2$ steril dengan konsentrasi Mg^{2+} dalam media sebesar 10-12,5 mg/L dan konsentrasi Ca^{2+} dalam media sebesar 20-25 mg/L

Selanjutnya membuat larutan induk $CaCl_2$ dengan melarutkan 0,2778 g $CaCl_2$ dalam 10 mL akuades demineralisasi sehingga didapat kadar 10 mg Ca^{2+} /ml dan membuat larutan induk $MgCl_2$ dibuat dengan melarutkan 0,3915 g $MgCl_2$ dalam 10 ml akuades demineralisasi sehingga didapat konsentrasi 10 mg Mg^{2+} /mL. Dari masing-masing larutan induk diambil $MgCl_2$ sebanyak 56,25 μ L serta larutan induk $CaCl_2$ sebanyak 112,5 μ L sehingga didapatkan konsentrasi 11,25 mg Mg^{2+} /L dan 22,5 mg Ca^{2+} /L.

3) Larutan Standar Mc Farland 0,5

Mc Farland 0,5 dibuat dengan mencampurkan BaCl_2 1% dengan 9,95ml H_2SO_4 kemudian divorteks hingga homogen. Selanjutnya dilakukan pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada λ 625 nm hingga didapat absorbansi dengan rentang 0,08-0,13.

c. Peremajaan Biakan Murni

Peremajaan biakan murni bakteri *Staphylococcus* dilakukan secara aseptis di dalam *Laminar Air Flow* (LAF). Jarum ose disterilisasi dengan dipijarkan pada spirtus lalu diambil biakan bakteri *Staphylococcus aureus* kemudian digoreskan pada media MHA. Selanjutnya media diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

d. Pembuatan Suspensi Bakteri

Bakteri dari kultur peremajaan biakan *Staphylococcus aureus* dari kultur peremajaan biakan murni diambil sebanyak 2-3 koloni dengan ose secara aseptis dan disuspensikan secara homogen dalam media CAMHB. Biakan tersebut kemudian disesuaikan kekeruhannya dengan Mc Farland 0,5 menggunakan bantuan spektrofotometer. Selanjutnya dilakukan pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada λ 625 nm hingga didapat absorbansi dengan rentang 0,08-0,13. Biakan kemudian diencerkan hingga 100 kali dari konsentrasi awal sehingga didapat suspensi 1×10^6 CFU/mL sebagai biakan aktif.

e. Pembuatan Kontrol Positif dan Kontrol Negatif

1) Kontrol negatif

Kontrol negatif uji aktivitas antibakteri yang digunakan adalah 1% DMSO dalam CAMHB.

2) Kontrol positif

Kontrol positif uji aktivitas antibakteri yang digunakan adalah sediaan injeksi 40 mg/ml yang diencerkan dengan CAMHB menjadi 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sebagai larutan induk. Larutan induk kemudian diencerkan menjadi 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$

f. Pembuatan Larutan Uji

Pembuatan larutan uji aktivitas antibakteri dengan melarutkan ekstrak liken *Phyloporon aciculare* dalam DMSO 10% sehingga didapatkan konsentrasi uji sebesar 100 µg/mL.

g. Uji Antibakteri Mikrodilusi

Suspensi bakteri dalam CAMHB diencerkan 100 kalinya menggunakan CAMHB hingga konsentrasi bakteri dari 1×10^8 CFU/mL menjadi 1×10^6 CFU/mL. Setiap sumuran berisi 50 µL suspensi bakteri dalam CAMHB, kemudian ditambahkan larutan uji, kontrol positif, atau kontrol negatif sebanyak 50 µL. Konsentrasi akhir bakteri tiap sumuran yaitu 5×10^4 CFU/mL. Kelompok perlakuan terdiri dari campuran 50 µL larutan ekstrak konsentrasi 100 µg/mL dalam DMSO 1% dan 50 µL bakteri (5×10^5 CFU/mL) dalam media CAMHB. Kontrol ekstrak merupakan campuran 50 µL larutan ekstrak konsentrasi 100 µg/mL dalam DMSO 1% dan 50 µL media CAMHB. Kontrol negatif ekstrak merupakan campuran 50 µL DMSO 1% dalam media CAMHB dan 50 µL bakteri dalam media CAMHB. Kontrol DMSO 1% yaitu campuran 50 µL DMSO 1% dalam media CAMHB dan 50 µL media CAMHB. Kontrol positif merupakan campuran 50 µL gentamisin konsentrasi 1 µg/mL dan 50 µL bakteri dalam media CAMHB. Kontrol gentamisin adalah campuran 50 µL gentamisin konsentrasi 1 µg/mL dan 50 µL media CAMHB. Kontrol negatif gentamisin terdiri dari campuran media CAMHB 50 µL dan bakteri dalam CAMHB 50 µL, sedangkan kontrol media yaitu media CAMHB sebanyak 100 µL. Semua perlakuan dilakukan tiga kali replikasi dan semua prosedur uji antibakteri dilakukan di dalam LAF. Berikut rancangan *mikroplate* untuk uji antibakteri.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Gambar 3.2 Rancangan *microplate* uji antibakteri liken *Phyloporon aciculare* Terhadap *Staphylococcus aureus*

Keterangan :

- a. Ekstrak dalam DMSO 1% 50 μ L + bakteri dalam CAMHB 50 μ L (kelompok perlakuan)
- b. Ekstrak dalam DMSO 1% 50 μ L + media CAMHB 50 μ L (kontrol ekstrak)
- c. Gentamisin 50 μ L + bakteri dalam CAMHB 50 μ L (kontrol positif)
- d. Gentamisin 50 μ L + media CAMHB 50 μ L (kontrol gentamisin)
- e. DMSO 1% dalam media CAMHB 50 μ L + bakteri dalam CAMHB 50 μ L (kontrol negatif)
- f. DMSO 1% dalam media CAMHB 50 μ L + media CAMHB 50 μ L (kontrol DMSO)
- g. Media CAMHB 50 μ L + bakteri dalam CAMHB 50 μ L (kontrol negatif gentamisin)
- h. Media CAMHB 100 μ L (kontrol media)

3.11 Analisa Data Uji Aktivitas Antibakteri

Pada penelitian ini, uji aktivitas antibakteri metode mikrodilusi menghasilkan data absorbansi yang berupa perubahan warna sesuai kandungan.

Persentase penghambatan bakteri terhadap hasil uji dapat dihitung menggunakan rumus berikut.

$$\% \text{ penghambatan} = \left(1 - \frac{(\text{Abs } R - \text{Abs } S)}{(\text{Abs } P - \text{Abs } Q)}\right) \times 100\%$$

Keterangan:

Abs = absorbansi

P = kontrol negatif (DMSO 1% atau media + suspensi bakteri)

Q = kontrol media (DMSO 1% atau media)

R = uji (ekstrak /gentamisin + suspensi bakteri)

S = kontrol uji (ekstrak /gentamisin + media)

(Quave dkk., 2008)

Hasil dari perhitungan di atas dianalisis dengan menggunakan metode statistika dengan perangkat lunak IBM SPSS Statistic 22. Analisis *t test* satu sampel dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan yang bermakna dengan $p < 0,05$.

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan penelitian, kesimpulan yang dapat diambil adalah sebagai berikut.

1. Pada penelitian ini berdasarkan analisis data NMR didapatkan senyawa mayor *P. aciculare* merupakan *methyl 2,4-dihydroxy-3,6-dimethylbenzoate* yang merupakan senyawa depside dengan rumus molekul $C_{10}H_{12}O_4$ yang mempunyai massa molekul sebesar 196 a.m.u. Massa molekul dikonfirmasi menggunakan LRMS $[M+H]^+$ sinyal pada 197 m/z.
2. Persen penghambatan aktivitas antibakteri *P. aciculare* terhadap *Staphylococcus aureus* sebesar $5,871 \pm 1,091\%$ dengan nilai $p < 0,05$ yang menunjukkan bahwa *P. aciculare* tidak memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

5.2 Saran

Adapun saran penelitian ini sebagai berikut.

1. Liken *P. aciculare* dapat dilakukan pemelitan aktivitas biologis lain selain uji antibakteri seperti uji antioksidan atau antikanker.
2. Penelitian antibakteri terhadap liken *P. aciculare* dapat dilakukan terhadap spesien bakteri lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Adams, M. 2009. *Staphylococcus Aureus and Other Pathogenic Gram-Positive Cocci*. Dalam *Foodborne Pathogens: Hazards, Risk Analysis and Control: Second Edition*. Elsevier Ltd.
- Adnani, N., S. R. Rajski, dan T. S. Bugni. 2017. Symbiosis-inspired approaches to antibiotic discovery. *Natural Product Reports*. 34(7):784–814.
- Aravind, S. R., T. T. Sreelekha, B. S. Dileep Kumar, S. N. Kumar, dan C. Mohandas. 2014. Characterization of three depside compounds from a western ghat lichen *parmelia erumpens kurok* with special reference to antimicrobial and anticancer activity. *RSC Advances*. 4(65):34632–34643.
- Astuti, W. D. dan W. W. I. Widjaja. 2016. Uji kemurnian isolat andrografolid dengan hplc fase terbalik. *Jurnal Farmasi Udayana Vol 5, No 2*
- Balci, M. 2005. *Basic ¹H- and ¹³C-NMR Spectroscopy*. Ankara, Turkey: Elsevier.
- Balouiri, M., M. Sadiki, dan S. K. Ibsouda. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: a review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 6(2):71–79.
- Bansal, R. dan A. Jain. 2014. Overview on the Current Antibiotic Containing Agents Used in Endodontics. *North American Journal of Medical Sciences*. 2014.
- Basile, A., D. Rigano, S. Loppi, A. Di Santi, A. Nebbioso, S. Sorbo, B. Conte, L. Paoli, F. De Ruberto, A. M. Molinari, L. Altucci, dan P. Bontempo. 2015. Antiproliferative, antibacterial and antifungal activity of the lichen *xanthoria parietina* and its secondary metabolite *parietin*. *International Journal of Molecular Sciences*. 16(4):7861–7875.
- Bax, R., N. Mullan, dan J. Verhoef. 2000. The millennium bugs--the need for and

development of new antibacterials. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 16(1):51–59.

Bessadóttir, M., E. Skúladóttir, S. Gowan, S. Eccles, S. Ómarsdóttir, dan H. M. Ögmundsdóttir. 2014. Effects of anti-proliferative lichen metabolite, protolichesterinic acid on fatty acid synthase, cell signalling and drug response in breast cancer cells. *Phytomedicine*. 21(12):1717–1724.

Bhattarai, H. D., B. Paudel, S. G. Hong, H. K. Lee, dan J. H. Yim. 2008. Thin layer chromatography analysis of antioxidant constituents of lichens from antarctica. *Journal of Natural Medicines*. 62(4):481–484.

Brisdelli, F., M. Perilli, D. Sellitri, M. Piovano, J. A. Garbarino, M. Nicoletti, A. Bozzi, G. Amicosante, dan G. Celenza. 2013. Cytotoxic activity and antioxidant capacity of purified lichen metabolites: an in vitro study. *Phytotherapy Research*. 27(3):431–437.

Bucar, F., I. Schneider, H. Ögmundsdóttir, dan K. Ingólfssdóttir. 2004. Anti-proliferative lichen compounds with inhibitory activity on 12(s)-hete production in human platelets. *Phytomedicine*. 11(7–8):602–606.

Burkholder, P. R., A. W. Evans, I. McVeigh, dan H. K. Thornton. 1944. Antibiotic activity of lichens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 30(9):250–255.

Burlando, B., E. Ranzato, A. Volante, G. Appendino, F. Pollastro, dan L. Verotta. 2009. Antiproliferative effects on tumour cells and promotion of keratinocyte wound healing by different lichen compounds. *Planta Medica*. 75(6):607–613.

Chandra Mohana, N., H. C. Yashavantha Rao, D. Rakshith, P. R. Mithun, B. R. Nuthan, dan S. Satish. 2018. Omics Based Approach for Biodiscovery of Microbial Natural Products in Antibiotic Resistance Era. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. June 1, 2018.

CLSI. 2015. CLSI M07 - Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests

for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard | Engineering360. https://standards.globalspec.com/std/1537900/CLSI_M07 [Diakses pada November 7, 2019].

- Dieu, A., M. Millot, Y. Champavier, L. Mambu, V. Chaleix, V. Sol, dan V. Gloaguen. 2014. Uncommon chlorinated xanthone and other antibacterial compounds from the lichen *cladonia incrassata*. *Planta Medica*. 80(11):931–935.
- Fass, R. J. dan J. Barnishan. 1979. Effect of divalent cation concentrations on the antibiotic susceptibilities of nonfermenters other than *pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 16(4):434–438.
- Felczykowska, A., A. Pastuszak-Skrzypczak, A. Pawlik, K. Bogucka, A. Herman-Antosiewicz, dan B. Guzow-Krzeminska. 2017. Antibacterial and anticancer activities of acetone extracts from in vitro cultured lichen-forming fungi. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 17(1)
- Forrest, R. D. 1982. Early history of wound treatment. *Journal of the Royal Society of Medicine*. 75(3):198–205.
- Ge, B., F. Wang, M. Sjölund-karlsson, dan P. F. Mcdermott. 2013. Antimicrobial resistance in campylobacter: susceptibility testing methods and resistance trends. *Journal of Microbiological Methods*. 95(1):57–67.
- Gillaspy, A. F., J. J. Iandolo, Y.-W. Tang, dan C. W. Stratton. 2015. *Staphylococcus* ☆. Dalam Reference Module in Biomedical Sciences. Elsevier.
- Gulluce, M., A. Aslan, M. Sokmen, F. Sahin, A. Adiguzel, G. Agar, dan A. Sokmen. 2006. Screening the antioxidant and antimicrobial properties of the lichens *parmelia saxatilis*, *platismatia glauca*, *ramalina pollinaria*, *ramalina polymorpha* and *umbilicaria nylanderiana*. *Phytomedicine*. 13(7):515–521.
- Hart, H., L. E. Craine, dan D. J. Hart. 2003. *Kimia Organik: Suatu Kuliah Singkat*

- Hashemi, S., A. Nasrollah, dan M. Rajabi. 2013. Irrational antibiotic prescribing: a local issue or global concern? *EXCLI Journal*. 12:384–395.
- Horino, T. dan S. Hori. 2019. Metastatic infection during staphylococcus aureus bacteremia. *Journal of Infection and Chemotherapy*
- Houghton, P. J. dan A. Raman. 2012. *Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts*. Springer.
- Huneck, S. dan I. Yoshimura. 1996. *Identification of Lichen Substances*. Springer Berlin Heidelberg. *Identification of Lichen Substances*.
- IMB. 2016. CO-ADD Screening Workflow. https://www.co-add.org/sites/co-add.org/files/CO-ADD_ScreeningWorkflow_May2016.pdf [Diakses pada April 21, 2020].
- Irianto, K. 2014. *Bakteriologi Medis , Mikologi Medis, Dan Virologi Medis*. alfabetta cv.
- ITIS. 1996. ITIS Standard Report Page: Pilophorus Acicularis. https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=14029#null [Diakses pada November 8, 2019].
- Kementerian Kesehatan RI. 2013. *Riset Kesehatan Dasar*. Jakarta
- Kranner, I., R. Beckett, A. Hochman, dan T. H. Nash. 2008. Desiccation-tolerance in lichens: a review. *The Bryologist*. 111(4):576–593.
- Leba, M. 2017. *Buku Ajar: Ekstraksi Dan Real Kromatografi*
- Mandal, S. C., V. Mandal, dan A. K. Das. 2015. *Essentials of Botanical Extraction: Principles and Applications*. London: Elsevier Inc.
- Maulidiyah, M., A. Hasan, W. O. Irna, I. F. Adiba Nurdin, T. Kusmalawati, . I., A. H. Watoni, T. Azis, dan A. Darmawan. 2018. Antifungal potential against aspergillus flavus: secondary metabolite compound from unique organism of lichen teloschistes flavicans. *International Research Journal Of Pharmacy*. 9(8):30–35.

- Molnár, K. dan E. Farkas. 2010. Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a review. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*. 65(3–4):157–173.
- Mutch, R. 2017. Devil's Matchstick Lichens, Limpy Rock, Oregon Photograph by Robert Mutch. <https://pixels.com/featured/devils-matchstick-lichens-limpy-rock-oregon-robert-mutch.html> [Diakses pada November 14, 2019].
- Negi, H. R. 2003. Lichens: a valuable bioresource for environmental monitoring and sustainable development. *Resonance*. 8(1):51–58.
- Nigam, A., D. Gupta, dan A. Sharma. 2014. Treatment of infectious disease: beyond antibiotics. *Microbiological Research*. 169(9–10):643–651.
- Nugraha, A. S. dan P. A. Keller. 2011. Revealing Indigenous Indonesian Traditional Medicine: Anti-Infective Agents. *Natural Product Communications*. 2011.
- Nugraha, Ari Satia, D. K. Pratoko, Y. D. Damayanti, N. D. Lestari, T. A. Laksono, H. S. Addy, L. F. Untari, B. Kusumawardani, dan P. Wangchuk. 2019. Antibacterial and anticancer activities of nine lichens of Indonesian Java island. *Journal of Biologically Active Products from Nature*. 9(1):39–46.
- Nugraha, A. S., L. F. Untari, A. Laub, A. Porzel, K. Franke, dan L. A. Wessjohann. 2020. Anthelmintic and antimicrobial activities of three new depsides and ten known depsides and phenols from Indonesian lichen: *Parmelia cetrata* Ach. *Natural Product Research*. 1–10.
- Nugraha, Ari S., T. Wangchuk, A. C. Willis, R. Haritakun, H. Sujadmiko, dan P. A. Keller. 2019. Phytochemical and pharmacological studies on four Indonesian epiphytic medicinal plants: *Drynaria rigidula*, *Hydnophytum formicarum*, *Usnea misaminensis*, and *Calymperes schmidtii*. *Natural Product Communications*. 14(6):1934578X1985679.
- Pavia, D. L., G. M. Lampan, G. S. Kriz, dan J. A. Vyvyan. 2009. *Introduction to Spectroscopy*

- Pavia, D. L., G. M. Lampman, G. S. Kriz, dan J. R. Vyvyan. 2010. *Introduction to Spectroscopy*. Edisi Fourth Edi. USA: Brooks/Cole Cengage Learning.
- Pereira, J., J. Gonçalves, V. Alves, dan J. S. Câmara. 2013. Microextraction using packed sorbent as an effective and high-throughput sample extraction technique: recent applications and future trends. *Sample Preparation*. 1:38–53.
- PlantScience4U.com. 2014. Difference between Isidia and Soredia. <https://www.plantscience4u.com/2014/07/difference-between-isidia-and-soredia.html#.Xc2Ag1dKg2w> [Diakses pada November 14, 2019].
- Pratiwi, S. T. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Yogyakarta: Erlangga.
- Quave, C. L., L. R. W. Plano, T. Pantuso, dan B. C. Bennett. 2008. Effects of extracts from italian medicinal plants on planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillin-resistant staphylococcus aureus. *Journal of Ethnopharmacology*. 118(3):418–428.
- Ragasa, C. Y., M. C. S. Tan, V. C. Linis, dan C.-C. Shen. 2018. A triterpene and a depside from parmotrema austrocetratum elix and j. johnst. *Pharmacognosy Journal*. 10(6s):s27–s29.
- Ramos, D. de B. M. R., T. H. Gomes, Francis Soares Napoleão, G. M. D. C. da Paiva, Patrícia Maria Silva, dan L. C. B. B. Coelho. 2014. Antimicrobial activity of cladonia verticillaris lichen preparations on bacteria and fungi of medical importance. *Hindawi Publishing Corporation Chinese Journal of Biology*. Volume 201
- Ranković, B. dan M. Kosanić. 2015. *Lichens as a Potential Source of Bioactive Secondary Metabolites*. Dalam *Lichen Secondary Metabolites: Bioactive Properties and Pharmaceutical Potential*. Springer International Publishing.
- Resende, D. I. S. P., P. Pereira-Terra, Â. S. Inácio, P. M. Da Costa, E. Pinto, E. Sousa, dan M. M. M. Pinto. 2018. Lichen xanthenes as models for new antifungal agents. *Molecules*. 23(10)

- Rondang Tambun, Harry P. Limbong, Christika Pinem, dan Ester Manurung. 2017. Pengaruh ukuran partikel, waktu, dan suhu pada ekstraksi fenol dari lengkuas merah. *Jurnal Teknik Kimia USU*. 5(4):53–56.
- Roziaty, E. 2016. Kajian lichen: morfologi, habitat dan bioindikator kualitas udara ambien akibat polusi kendaraan bermotor. *Bioeksperimen: Jurnal Penelitian Biologi*. 2(1):54–66.
- Samuelsson, G. dan L. Bohlin. 2017. *Drugs of Natural Origin: A Treatise of Pharmacognosy*. Swedish Pharmaceutical Press.
- Samuelsson, G., L. Bohlin, dan Swedish Academy of Pharmaceutical Sciences. 2009. *Drugs of Natural Origin: A Treatise of Pharmacognosy*. Apotekarsocieteten.
- Sandle, T. 2016. *Antibiotics and Preservatives*. Dalam *Pharmaceutical Microbiology*. Elsevier.
- Sarker, S. D. 2012. *Natural Products Isolation*
- Shabur Julianto, T. 2019. *Fitokimia Tinjauan Metabolit Sekunder Dan Skrining Fitokimia*
- Shrestha, G. dan L. L. St. Clair. 2013. Lichens: a promising source of antibiotic and anticancer drugs. *Phytochemistry Reviews*. 12(1):229–244.
- Silhavy, T. J., D. Kahne, dan S. Walker. 2010. *The Bacterial Cell Envelope*. Cold Spring Harbor perspectives in biology. 2010.
- Suh, S. S., T. K. Kim, J. E. Kim, J. M. Hong, T. T. T. Nguyen, S. J. Han, U. J. Youn, J. H. Yim, dan I. C. Kim. 2017. Anticancer activity of ramalin, a secondary metabolite from the antarctic lichen ramalina terebrata, against colorectal cancer cells. *Molecules*. 22(8)
- Tanaka, J. C. A., C. C. da Silva, A. J. B. de Oliveira, C. V. Nakamura, dan B. P. Dias Filho. 2006. Antibacterial activity of indole alkaloids from *aspidosperma ramiflorum*. *Brazilian Journal of Medical and Biological*

Research. 39(3):387–391.

TDS. 2012. *Global Report for Research on Infectious Diseases of Poverty*

The European Communities. 2002. *COMMISSION DIRECTIVE 2002/69/EC*

Timm, M., L. Saaby, L. Moesby, dan E. W. Hansen. 2013. Considerations regarding use of solvents in in vitro cell based assays. *Cytotechnology*. 65(5):887–894.

VetBact.org. 2018. VetBact | Staphylococcus Aureus. <http://vetbact.org/> [Diakses pada November 14, 2019].

Wells, B. G., J. T. DiPiro, T. L. Schwinghammer, dan C. V. DiPiro. 2017. *Pharmacotherapy Handbook*

WHO. 2016a. WHO. Infectious Diseases. https://www.who.int/topics/infectious_diseases/en/ [Diakses pada November 2, 2019].

WHO. 2016b. The Top 10 Causes of Death. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> [Diakses pada November 2, 2019].

WHO. 2018. The Top 10 Causes of Death. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> [Diakses pada November 11, 2019].

WHO. 2019. World Antibiotic Awareness Week. <https://www.who.int/news-room/events/detail/2019/11/18/default-calendar/world-antibiotic-awareness-week-2019> [Diakses pada November 2, 2019].

Yanling, J., L. Xin, dan L. Zhiyu. 2013. *The Antibacterial Drug Discovery*. Dalam Drug Discovery. InTech.

Yilmaz, M., A. Ö. Türk, M. Kivanç, dan T. Tay. 2004. The antimicrobial activity of extracts of the lichen *Cladonia foliacea* and its (-)-usnic acid, atranorin, and fumarprotocetraric acid constituents. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*. 59(3–4):249–254.

Yuan, C. 2010. Antibacterial compounds and other constituents of evernia divaricata (L.) ach.



LAMPIRAN**Lampiran 1. Perhitungan Pembuatan Ekstraksi**

$$\begin{aligned}
 \text{Berat serbuk kering liken} &= 50,0 \text{ gram} \\
 \text{Ekstrak kering} &= 0,8591 \text{ gram} \\
 \text{Rendemen ekstrak etanol} &= \frac{\text{Berat ekstrak kering}}{\text{Berat serbuk awal}} \times 100\% \\
 &= \frac{0,8591 \text{ gram}}{50,0 \text{ gram}} \times 100\% \\
 &= 1,7182\%
 \end{aligned}$$

Lampiran 2. Perhitungan Pembuatan Fraksinasi

$$\begin{aligned}
 \text{Berat ekstrak untuk fraksinasi} &= 0,5 \text{ g} \\
 \text{Berat wadah + fraksi heksana} &= 10,6702 \text{ g} \\
 \text{Berat wadah kosong} &= 10,3838 \text{ gram} \\
 \text{Fraksi heksana} &= 0,286 \text{ gram} \\
 \text{Rendemen fraksi heksana} &= \frac{\text{Berat fraksi}}{\text{Berat ekstrak untuk fraksinasi}} \times 100\% \\
 &= \frac{0,286 \text{ gram}}{0,5 \text{ gram}} \times 100\% \\
 &= 57,2\%
 \end{aligned}$$

Lampiran 3. Perhitungan Konsentrasi Gentamisin Uji Antibakteri**1. Pembuatan larutan induk gentamisin**

$$\begin{aligned}
 \text{Bahan} &= \text{larutan injeksi gentamisin sulfat konsentrasi } 40 \text{ mg/mL} \\
 \text{BM gentamisin sulfat} &= 575,675 \text{ g/mol} \\
 \text{BM gentamisin} &= 477,596 \text{ g/mol} \\
 \text{Konsentrasi gentamisin} &= \frac{\text{BM gentamisin}}{\text{BM gentamisin sulfat}} \times 40 \text{ mg/mL} \\
 &= \frac{477,596 \text{ g/mol}}{575,675 \text{ g/mol}} \times 40 \text{ mg/mL}
 \end{aligned}$$

$$= 33,185 \text{ mg/mL}$$

$$= 33185 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

Konsentrasi larutan induk gentamisin yang dibutuhkan yaitu 100 $\mu\text{g/mL}$:

$$\frac{\text{volume yang diambil dari gentamisin sulfat}}{10000 \text{ } \mu\text{L media CAMHB}} \times 33185 \text{ } \mu\text{g/mL} = 100 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

Volume yang dipipet dari larutan gentamisin sulfat = 30,1 μL ad media CAMHB 10000 μL sehingga konsentrasi larutan induk gentamisin 100 $\mu\text{g/mL}$.

2. Pengenceran larutan induk gentamisin

Konsentrasi gentamisin yang dibutuhkan untuk uji aktivitas antibakteri yaitu 1 $\mu\text{g/mL}$:

$$\frac{\text{volume yang diambil dari larutan induk}}{10000 \text{ } \mu\text{L media CAMHB}} \times 100 \text{ } \mu\text{g/mL} = 1 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

Volume yang dipipet dari larutan induk gentamisin = 100 μL ad media CAMHB 10000 μL sehingga konsentrasi gentamisin untuk kontrol positif 1 $\mu\text{g/mL}$.

Lampiran 4. Perhitungan Pembuatan Media CAMHB

A. Larutan Induk MgCl

1. Berat MgCl yang harus ditimbang

Berat molekul $\text{MgCl}_2 = 95,211 \text{ g/mol}$

Berat molekul $\text{Mg}^{2+} = 24,305 \text{ g/mol}$

Dibutuhkan larutan induk MgCl_2 dengan konsentrasi 10 mg Mg^{2+}/ml .

$$\begin{aligned} \text{Jumlah } \text{MgCl}_2 \text{ dibutuhkan} &= \frac{\text{BM } \text{MgCl}_2}{\text{BM } \text{Mg}^{2+}} \times 10 \text{ mg/ml} \times 10 \text{ ml} \\ &= \frac{95,211 \text{ g/mol}}{24,305 \text{ g/mol}} \times 10 \text{ mg/ml} \times 10 \text{ ml} \\ &= 391,23 \text{ mg} \end{aligned}$$

2. Kadar MgCl yang harus dipipet agar kadar Mg^{2+} 11,25 mg/L

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

$$10 \text{ mg/ml} \times V_1 = 11,25 \text{ mg/L} \times 50 \text{ ml}$$

$$V_1 = 0,05625 \text{ ml}$$

B. Larutan Induk CaCl

1. Berat CaCl yang harus ditimbang

Berat molekul $\text{CaCl}_2 = 110,078 \text{ g/mol}$

Berat molekul $\text{Ca}^{2+} = 40,078 \text{ g/mol}$

Dibutuhkan larutan induk MgCl_2 dengan konsentrasi $10 \text{ mg Mg}^{2+}/\text{ml}$.

$$\begin{aligned} \text{Jumlah MgCl}_2 \text{ dibutuhkan} &= \frac{\text{BM CaCl}_2}{\text{BM Ca}^{2+}} \times 10 \text{ mg/ml} \times 10 \text{ ml} \\ &= \frac{110,078 \text{ g/mol}}{40,078 \text{ g/mol}} \times 10 \text{ mg/ml} \times 10 \text{ ml} \\ &= 279,91 \text{ mg} \end{aligned}$$

2. Kadar MgCl yang harus dipipet agar kadar $\text{Mg}^{2+} = 22,25 \text{ mg/L}$

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$10 \text{ mg/ml} \times V1 = 22,25 \text{ mg/L} \times 50 \text{ ml}$$

$$V1 = 0,1125 \text{ ml}$$

Lampiran 5. Perhitungan Konsentrasi Ekstrak Uji Aktivitas Antibakteri

Penimbangan eksteak = $104,8 \mu\text{g}$

Pengenceran ekstrak dengan DMSO = $104,8 \mu\text{L} \sim 104,8 \text{ mg}$

Konsentrasi ekstrak yang dilarutkan DMSO = $\frac{104,8 \mu\text{g}}{104,8 \text{ mg}} = 10000 \mu\text{g/mg}$

Jumlah ekstrak yang di pipet = $30 \mu\text{L}$

Media CAMHB yang ditambahkan = $2970 \mu\text{L}$

Konsentrasi akhir ekstrak = $\frac{30 \mu\text{L} \times 1000 \mu\text{g/mg}}{3000 \mu\text{L}} = 100 \mu\text{g/mL}$

Lampiran 6. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Metode Mikrodilusi Konsentrasi Tunggal

Absorbansi λ 625 nm

	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3	Rata-Rata
Kelompok Perlakuan	0.914	0.923	0.933	0,923
Kontrol Ekstrak	0,103	0,103	0,103	0,103
Kontrol Positif	0,122	0,122	0.123	0,122
Kontrol Gentamisin	0,109	0,111	0,111	0,110
Kontrol Negatif Ekstrak	0,973	0,975	0,978	0,975
Kontrol DMSO	0,103	0,104	0,105	0,104
Kontrol Negatif Gentamisin	0,831	0,837	0,849	0,839
Kontrol Media	0,110	0,111	0,111	0,111

Lampiran 7. Perhitungan Uji Antibakteri

$$\% \text{ penghambatan} = \left(1 - \frac{(Abs R - Abs S)}{(Abs P - Abs Q)}\right) \times 100\%$$

Keterangan:

Abs = absorbansi

P = kontrol negatif (DMSO 1% atau media + suspensi bakteri)

Q = kontrol media (DMSO 1% atau media)

R = uji (ekstrak /gentamisin + suspensi bakteri)

S = kontrol uji (ekstrak /gentamisin + media)

1. Persen Penghambatan Ekstrak

$$\left(1 - \frac{(\text{Kontrol Perlakuan} - \text{Kontrol Ekstrak})}{(\text{Kontrol Negatif Ekstrak} - \text{Kontrol DMSO})}\right) \times 100\%$$

$$\% \text{ penghambatan Ekstrak} = \left(1 - \frac{(0,923 - 0,103)}{(0,975 - 0,104)}\right) \times 100\% = 5,855\%$$

2. Persen Penghambatan Gentamisin

$$\left(1 - \frac{(\text{Kontrol Positif} - \text{Kontrol Gentamisin})}{(\text{Kontrol Negatif Gentamisin} - \text{Kontrol Media})}\right) \times 100\%$$

$$\% \text{ penghambatan Gentamisin} = \left(1 - \frac{(0,122 - 0,110)}{(0,839 - 0,111)}\right) \times 100\% = 98,456\%$$

3. Persen Penghambatan DMSO

$$\left(1 - \frac{(\text{Kontrol Negatif Ekstrak} - \text{Kontrol DMSO})}{(\text{Kontrol Negatif Gentamisin} - \text{Kontrol Media})}\right) \times 100\%$$

$$\% \text{ penghambatan Ekstrak} = \left(1 - \frac{(0,975 - 0,104)}{(0,839 - 0,111)}\right) \times 100\% = -19,643\%$$

Lampiran 8. Analisis Data Hasil Uji Aktivitas Antibakteri**Tests of Normality**

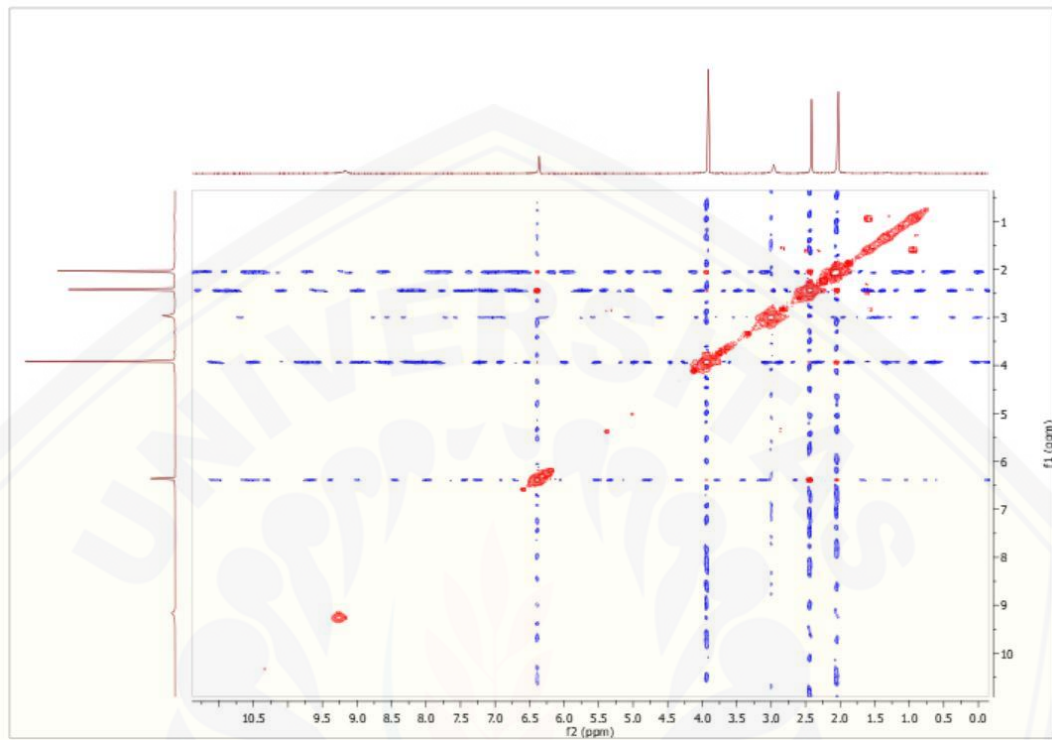
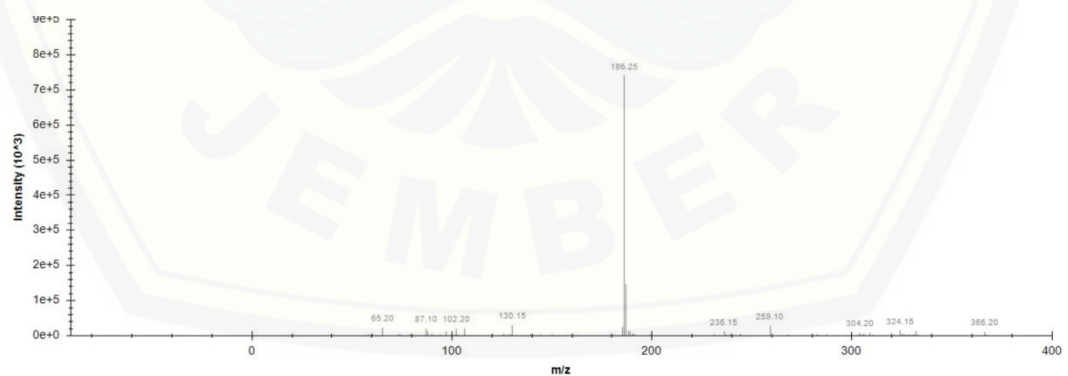
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Persen_Penghambatan	.191	3	.	.997	3	.900

One-Sample Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Persen_Penghambatan	3	5.8333	1.10151	.63596

One-Sample Test

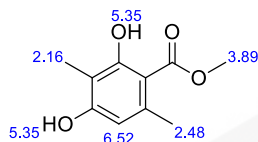
	Test Value = 0					
	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
Persen_Penghambatan	9.172	2	.012	5.83333	3.0970	8.5696

Lampiran 9. Data Nuclear Magnetic Resonance (NMR)**1. Spektra gCOSY NMR Senyawa Mayor *P. aciculare*****Lampiran 10. Data Mass Spectroscopy**

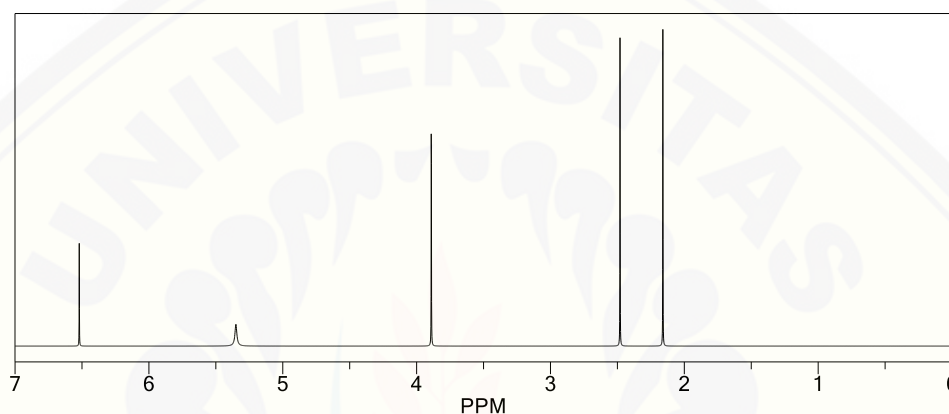
Lampiran 11. ChemDraw Prediksi NMR

1. Prediksi $^1\text{H-NMR}$

ChemNMR ^1H Estimation



Estimation quality is indicated by color: good, medium, rough



Protocol of the H-1 NMR Prediction:

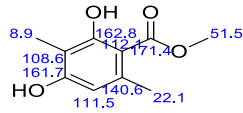
Node	Shift	Base + Inc.	Comment (ppm rel. to TMS)
OH	5.35	5.00	aromatic C-OH
		0.35	general corrections
OH	5.35	5.00	aromatic C-OH
		0.35	general corrections
CH	6.52	7.26	1-benzene
		-0.44	1 -O
		-0.53	1 -O
		-0.12	1 -C
		0.11	1 -C(=O)OC
		-0.20	1 -C
		0.44	general corrections
CH3	3.89	0.86	methyl
		3.02	1 alpha -OC(=O)-1:C*C*C*C*C*1
		0.01	general corrections
CH3	2.16	0.86	methyl
		1.49	1 alpha -1:C*C*C*C*C*1
		-0.19	general corrections
CH3	2.48	0.86	methyl
		1.49	1 alpha -1:C*C*C*C*C*1
		0.13	general corrections

^1H NMR Coupling Constant Prediction

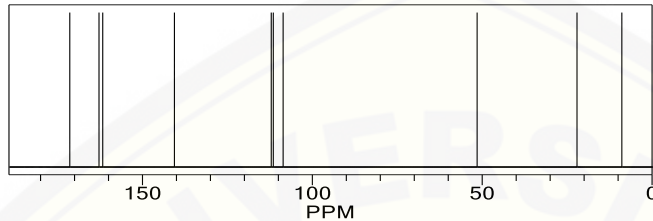
shift	atom index	coupling partner, constant and vector
5.35	13	
5.35	12	
6.52	6	
3.89	14	
2.16	11	
2.48	10	

2. Prediksi ^{13}C -NMR

ChemNMR ^{13}C Estimation



Estimation quality is indicated by color: **good**, **medium**, **rough**



Protocol of the C-13 NMR Prediction:

Node	Shift	Base + Inc.	Comment (ppm rel. to TMS)
C	162.8	128.5	1-benzene
		28.8	1 -O
		1.4	1 -O
		0.7	1 -C
		1.2	1 -C(=O)-O-C
		-0.1	1 -C
		2.3	general corrections
C	161.7	128.5	1-benzene
		1.4	1 -O
		28.8	1 -O
		0.7	1 -C
		4.3	1 -C(=O)-O-C
		-0.1	1 -C
		-1.9	general corrections
C	108.6	128.5	1-benzene
		-12.8	1 -O
		-12.8	1 -O
		9.2	1 -C
		-0.1	1 -C(=O)-O-C
		-3.0	1 -C
		-0.4	general corrections
C	112.1	128.5	1-benzene
		-12.8	1 -O
		-7.4	1 -O
		-0.1	1 -C
		2.0	1 -C(=O)-O-C
		0.7	1 -C
		1.2	general corrections
C	140.6	128.5	1-benzene
		1.4	1 -O
		1.4	1 -O
		-3.0	1 -C
		1.2	1 -C(=O)-O-C
		9.2	1 -C
		1.9	general corrections
CH	111.5	128.5	1-benzene
		-7.4	1 -O
		-12.8	1 -O
		-0.1	1 -C
		-0.1	1 -C(=O)-O-C
		0.7	1 -C
		2.7	general corrections
C	171.4	166.0	1-carboxyl
		6.0	1 -1:C*C*C*C*C*1
		-5.0	1 -C from O-carboxyl
		4.4	general corrections
CH3	51.5	-2.3	aliphatic
		54.9	1 alpha -O-C=O
		-2.6	1 gamma -1:C*C*C*C*C*1
		1.5	general corrections
CH3	8.9	-2.3	aliphatic
		24.3	1 alpha -1:C*C*C*C*C*1
		-12.4	2 gamma -O
		0.0	1 delta -C(=O)-O
		-0.7	general corrections
CH3	22.1	-2.3	aliphatic
		24.3	1 alpha -1:C*C*C*C*C*1
		-2.8	1 gamma -C(=O)-O
		0.6	2 delta -O
		2.3	general corrections