



**ISOLASI DAN KARAKTERISASI SENYAWA MAYOR SERTA
UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK METANOL
LIKEN *Parmelia aurulenta* Tuck. TERHADAP *Staphylococcus
aureus***

SKRIPSI

Oleh:

Lilla Nur Firli

NIM 162210101148

**BAGIAN KIMIA FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER**

2020



**ISOLASI DAN KARAKTERISASI SENYAWA MAYOR SERTA
UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK METANOL
LIKEN *Parmelia aurulenta* Tuck. 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:

Lilla Nur Firli

NIM 162210101148

BAGIAN KIMIA FARMASI

FAKULTAS FARMASI

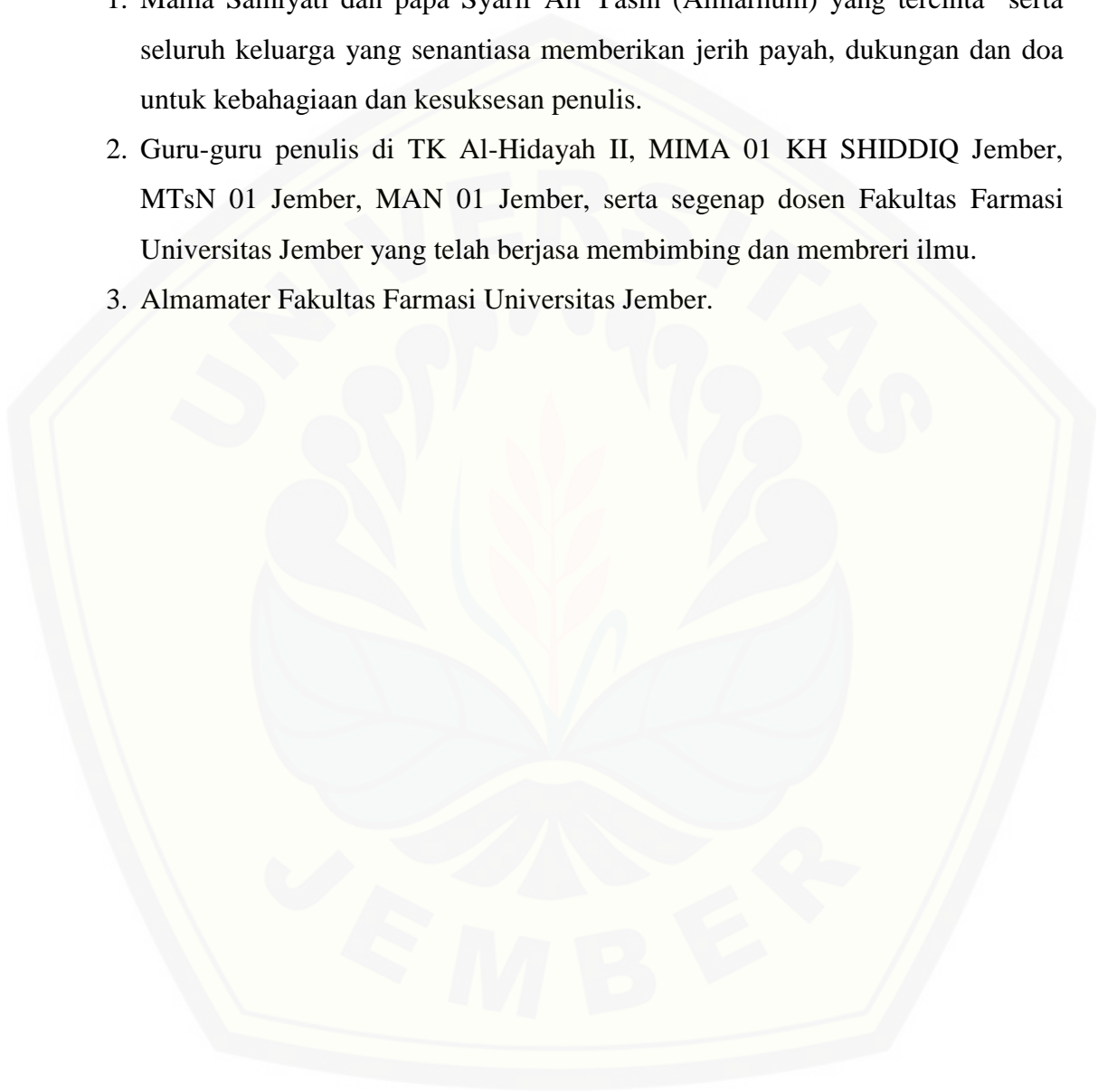
UNIVERSITAS JEMBER

2020

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Mama Samiyati dan papa Syarif Ali Yasin (Almarhum) yang tercinta serta seluruh keluarga yang senantiasa memberikan jerih payah, dukungan dan doa untuk kebahagiaan dan kesuksesan penulis.
2. Guru-guru penulis di TK Al-Hidayah II, MIMA 01 KH SHIDDIQ Jember, MTsN 01 Jember, MAN 01 Jember, serta segenap dosen Fakultas Farmasi Universitas Jember yang telah berjasa membimbing dan membreri ilmu.
3. Almamater Fakultas Farmasi Universitas Jember.



MOTO

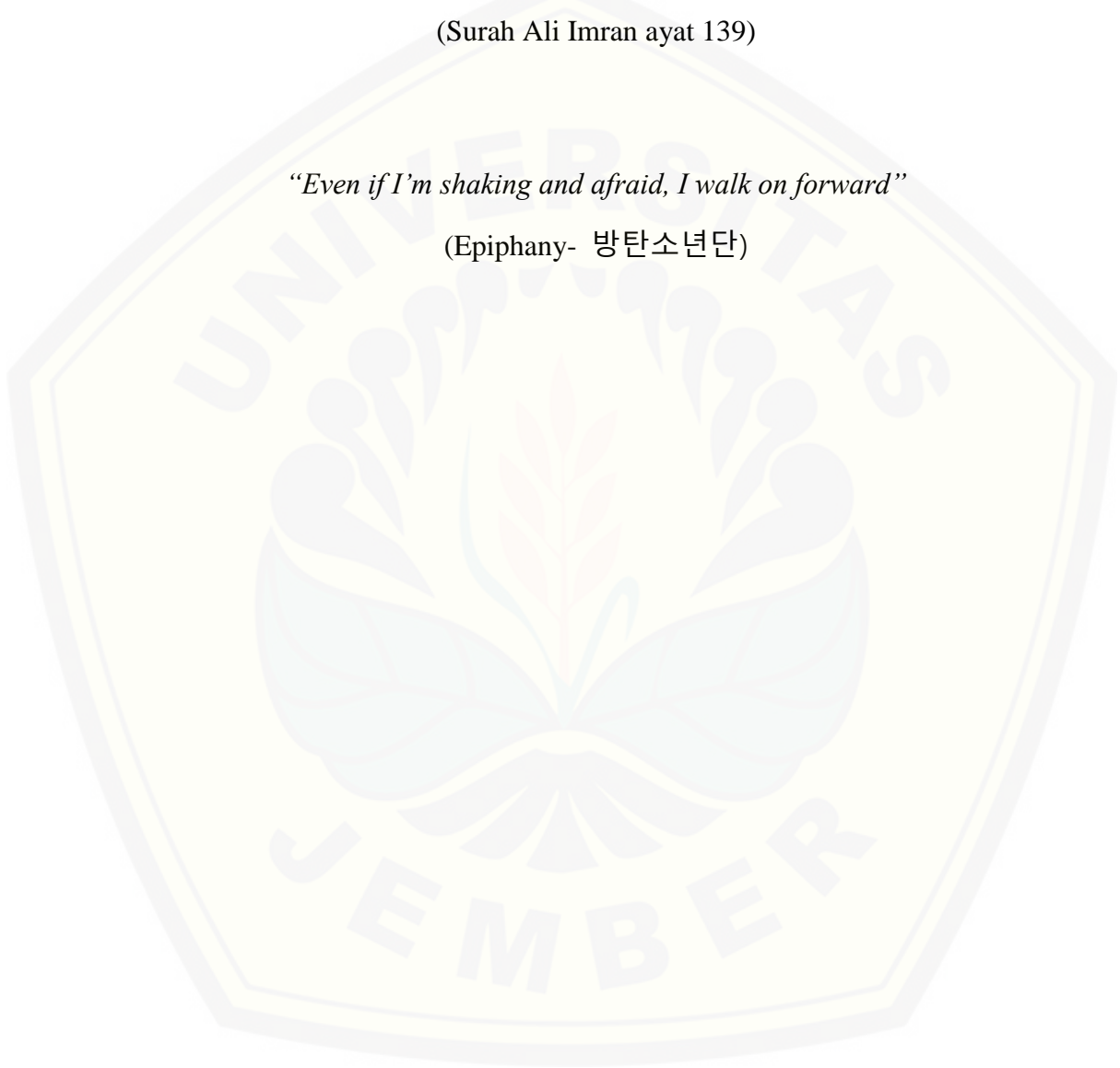
وَلَا تَهِنُوا وَلَا تَحْزَنُوا

“Do not lose hope nor be sad “

(Surah Ali Imran ayat 139)

“Even if I’m shaking and afraid, I walk on forward”

(Epiphany- 방탄소년단)



PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Lilla Nur Firli

NIM : 162210101148

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul "Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Mayor serta Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Liken *Parmelia aurulenta* Tuck. 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, 18 Juni 2020

Yang menyatakan,

Lilla Nur Firli

NIM 162210101148

SKRIPSI

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI SENYAWA MAYOR SERTA
UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK METANOL
LIKEN *Parmelia aurulenta* Tuck. TERHADAP *Staphylococcus
aureus***

Oleh:

Lilla Nur Firli

NIM 162210101148

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : apt. Ari Satia Nugraha, SF., GDipSc., MSc-Res.,
PhD.

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

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Mayor serta Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Liken *Parmelia aurulenta* Tuck. terhadap *Staphylococcus aureus*” karya Lilla Nur Firli telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Kamis, 18 Juni 2020

tempat : Fakultas Farmasi Universitas Jember

Tim Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama,

Dosen Pembimbing Anggota,



apt. Ari S. N., SF., GDip.Sc., MSc-Res., PhD.
NIP 197807212003121001

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

Tim Penguji

Dosen Penguji I,

Dosen Penguji II,



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

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

Mengesahkan

Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember,

apt. Lestyo Wulandari, S.Si., M.Farm.
NIP 197604142002122001

RINGKASAN

Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Mayor serta Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Liken *Parmelia aurulenta* Tuck. terhadap *Staphylococcus aureus*:

Lilla Nur Firli: 162210101148; 2020; 98 Halaman; Fakultas Farmasi, Universitas Jember

Penyakit infeksi merupakan penyakit yang disebabkan oleh mikroorganisme patogen yaitu bakteri, virus, parasit, dan jamur yang menjadi penyebab utama dari morbiditas dan mortalitas dalam sebagian besar sejarah kehidupan manusia. Penyakit infeksi banyak terjadi di negara-negara berpenghasilan rendah daripada negara-negara berpenghasilan tinggi. Penggunaan antibiotik yang merupakan obat untuk mencegah dan mengatasi penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri secara tidak tepat dan berlebihan menyebabkan terjadinya perkembangan resistensi bakteri terhadap antibiotik, sehingga perlu dilakukan upaya penemuan alternatif antibiotik atau antibakteri baru.

Dalam perkembangan antibakteri, penemuan antibakteri penisilin berasal dari bahan alam berupa jamur yang termasuk dalam Kingdom Fungi oleh Alexander Fleming pada tahun 1928. Jamur menjadi salah satu komponen simbiosis dalam pembentukan liken. Hal tersebut membuka peluang untuk melakukan penelitian mengenai aktivitas antibakteri yang dimiliki oleh liken. Dari keseluruhan spesies liken yang ada di Indonesia hanya sedikit yang telah diinvestigasi.

Berdasarkan latar belakang tersebut, pada penelitian ini dilakukan isolasi dan karakterisasi senyawa mayor liken *P. aurulenta* serta uji aktivitas antibakteri ekstrak metanol liken *P. aurulenta* terhadap *S. aureus*. Isolasi senyawa dilakukan dengan menggunakan HPLC. Karakterisasi senyawa dilakukan dengan menggunakan ESI-MS dan NMR. Uji aktivitas antibakteri ekstrak metanol liken dilakukan dengan metode mikrodilusi sesuai dengan protokol standar yang ditetapkan CLSI. Kontrol positif yang digunakan dalam uji aktivitas antibakteri pada penelitian ini adalah gentamisin, sedangkan kontrol negatif yang digunakan adalah DMSO 1% dalam media.

Hasil isolasi menunjukkan bahwa senyawa mayor liken *P. aurulenta* memiliki waktu retensi 19 menit 32,8 detik sedangkan pada hasil uji kemurnian

waktu retensi menjadi lebih pendek yaitu pada 12 menit 25,3 detik yang disebabkan oleh perbedaan kolom HPLC yang digunakan. Hasil analisis data NMR meliputi spektra 1D-NMR ($^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$) dan 2D-NMR (gCOSY, gHSQC, dan gHMBC) menunjukkan bahwa senyawa mayor liken *P. aurulenta* merupakan struktur *didepside* dari *2'-hydroxy-4'-((2-hydroxy-4-methoxy-6-propylbenzoyl)oxy)-6'-propylbenzoic acid* dengan rumus molekul $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_7$. Hasil analisis data LRMS diketahui bahwa senyawa senyawa mayor liken menunjukkan molekul ion $[\text{M}+\text{H}]^+$ pada puncak 389 m/z dengan massa sebenarnya $[\text{M}]$ sebesar 388 amu.

Berdasarkan hasil pengujian aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus*, diketahui bahwa presentase penghambatan pertumbuhan bakteri oleh gentamisin telah memenuhi rentang yang dipersyaratkan oleh CLSI, 2017 yaitu sebesar $99,5 \pm 0,2\%$ pada konsentrasi pengujian 1 $\mu\text{g/mL}$. Uji aktivitas antibakteri pada ekstrak metanol liken menunjukkan bahwa ekstrak metanol memiliki presentase penghambatan pertumbuhan bakteri sebesar $97,2 \pm 0,6\%$ ($p \leq 0,05$). Presentase penghambatan pertumbuhan bakteri memiliki nilai lebih dari 80% yang menunjukkan bahwa ekstrak tersebut memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus*.

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul “Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Mayor serta Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Liken *Parmelia aurulenta* Tuck. terhadap *Staphylococcus aureus*”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Penyusunan proposal skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak baik secara lisan maupun tulisan, maka dari itu penulis ingin menyampaikan ucapan terimakasih kepada:

1. Allah SWT yang telah memberikan kenikmatan dan kesempatan kepada penulis sehingga skripsi ini terselesaikan; serta Nabi Muhammad SAW yang senantiasa menjadi panutan bagi penulis;
2. Ibu apt. Lestyo Wulandari, S.Si., M.Farm. selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember atas kesempatan yang diberikan untuk menyelesaikan skripsi;
3. Bapak apt. Ari Satia Nugraha, SF., GDipSc., MSc-Res., PhD. selaku Dosen Pembimbing Utama dan Bapak apt. Dwi Koko Pratoko, S.Farm., M.Sc. selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu untuk memberikan arahan, bimbingan, fasilitas dan semangat sehingga penulis dapat menyusun skripsi ini dengan baik;
4. Ibu apt. Indah Purnama Sary, S.Si.,M.Farm. selaku Dosen Penguji I dan Ibu apt. Nia Kristiningrum, S.Farm.,M.Farm. selaku Dosen Penguji II yang telah memberikan masukan berupa kritik dan saran selama penyusunan skripsi;
5. Ibu apt. Dewi Dianasari, S.Farm., M.Farm. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang senantiasa memberikan arahan dan bimbingan serta semangat terkait akademik bagi penulis selama kuliah di Fakultas Farmasi Universitas Jember;

6. Seluruh dosen Fakultas Farmasi Universitas Jember yang telah memberikan ilmu, bimbingan dan motivasi kepada penulis;
7. Ibu Wayan, Ibu Hani, dan Ibu Itus selaku laboran yang telah membantu penulis dalam melakukan penelitian di laboratorium;
8. Mama Samiyati dan Alm. Papa Syarif Ali Yasin yang selalu menjadi semangat dalam kehidupan penulis atas jerih payah, doa, bimbingan, motivasi dan kasih sayang yang senantiasa diberikan untuk kelancaran dan keberhasilan dalam menyelesaikan studi di Fakultas Farmasi Universitas Jember.
9. Alm. Nenek Muginten, Paman Andayani, Koko Abdullah Nasir, Koko Ahmad Zein, Cece Siti Halimah, Cece Khusnul Khotimah, Cece Siti Nur Latifah, dan Titi Zulkarnain Nasrullah terimakasih atas doa, dukungan dan semangat yang diberikan kepada penulis.
10. Mbak Nining, Mbak Renda, Mas Luthfi, Mas Arif, Mas Irawan, Nabila, Zaky, Earlyta, Haura, Misha, Fatih, Zyan, Rifqi, Najwa dan keluarga besar yang selalu memberikan semangat kepada penulis;
11. Chintya Permata Zahky Sukrisno Putri yang telah menjadi *partner* dalam melakukan seluruh tahapan penelitian dan menjadi teman bertukar pikiran selama di DUDRG;
12. Teman “Anak Kolom” Yoshinta Debby P. dan Mas Ridho yang selalu menjadi *partner* lembur dan survei kuliner.
13. Anggota Lichen Project, Mbak Tari, Mbak Yuvi, Mas Tinton, Dini, Dinar yang selalu membantu penulis dalam penelitian.
14. Teman-teman Soil Project, Afrian, Ferina, Ziyani, Kibti, dan Arofa yang saling membantu berbagi masukan dan berkeluh kesah selama penelitian; serta Jihan Fatmalah yang turut membantu dan memberi masukan;
15. Seluruh anggota kelompok riset *Drug Utilisation and Discovery Research Group* (DUDRG).

16. Teman-Teman “Soon too low you” Ziyah, Jes, Putri, Miyah, dan Cunil yang selalu menjadi teman berbagi keluh kesah, gurauan semangat dan teman belajar bagi penulis;
17. Partner “Barakallah Filipina” Ibu Fifteen, Mas Tinton, Cepe, Ghea, Jihan, Inu dan Anjas yang telah berbagi pengalaman dan selalu memberi motivasi;
18. Segenap anggota kelas C angkatan 2016 dan teman-teman MORFIN 2016 yang selalu memberikan bantuan, dukungan, dan semangat bagi penulis;
19. Segenap anggota KISMIS 2016, Badan Perwakilan Mahasiswa Fakultas Farmasi Universitas Jember periode 2017-2019, dan KKN 220 Desa Padang yang selalu menjadi inspirasi, sumber motivasi, bagi penulis untuk menjadi lebih baik.
20. Semua pihak yang berperan dalam penyusunan skripsi ini dan tidak dapat disebutkan penulis satu per satu, terimakasih.

Hanya doa dan ucapan terima kasih yang dapat penulis sampaikan atas semua kebaikan dan dukungan yang telah diberikan. Penulis menyadari bahwa masih terdapat kelemahan dan kekurangan pada skripsi ini. Penulis mengharapkan adanya kritik dan saran dari pembaca agar skripsi ini menjadi lebih baik. Penulis berharap agar skripsi ini bermanfaat.

Jember, Mei 2020

Penulis

DAFTAR ISI

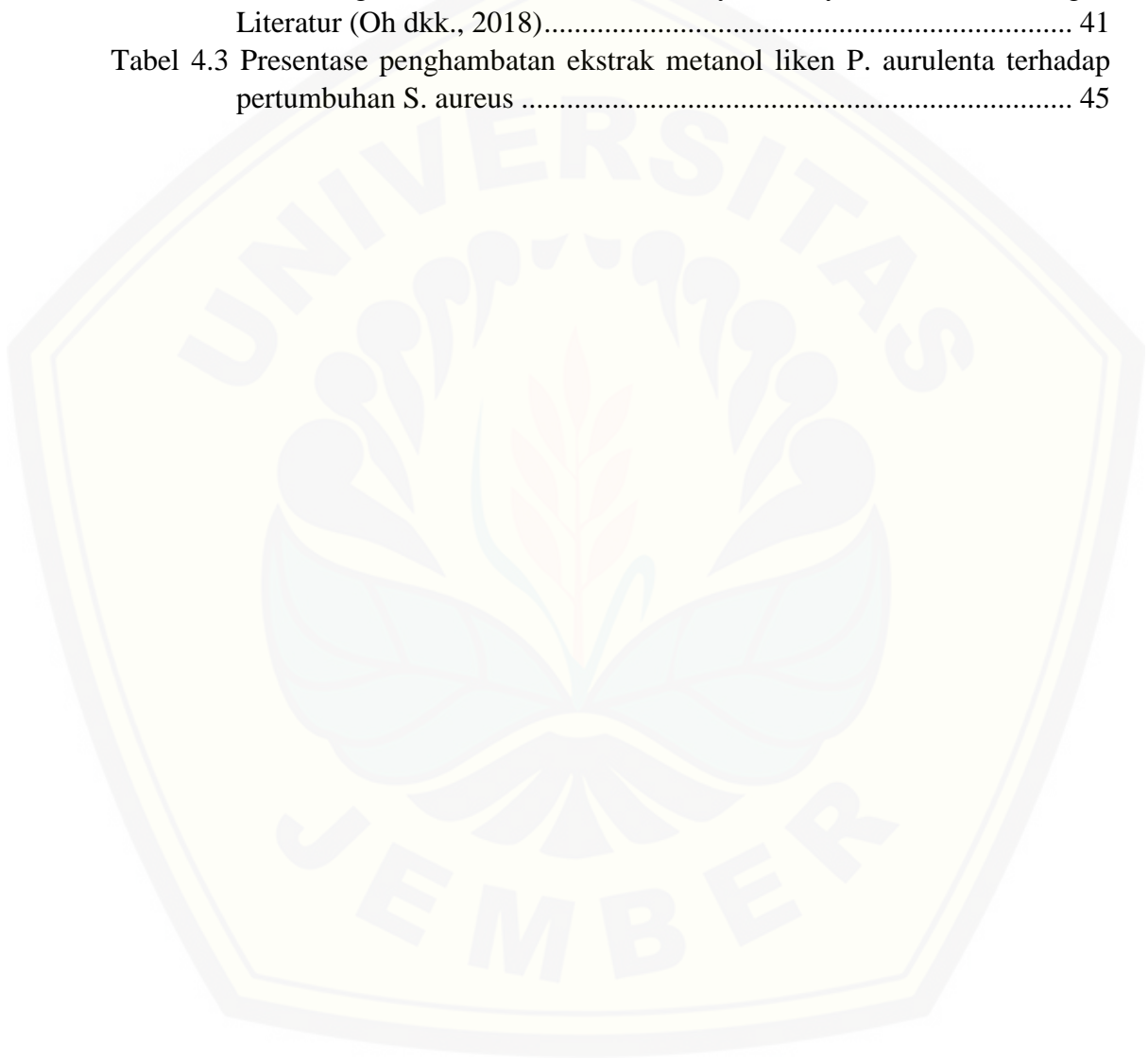
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR TABEL	xvii
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR RUMUS	xviii
DAFTAR SINGKATAN	xix
DAFTAR LAMPIRAN	xixxi
BAB 1. PENDAHULUAN	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
2.1.1 Infeksi Bakteri	5
2.1.2 Staphylococcus aureus	6
2.2 Antibakteri	8
2.3 Liken	9
2.3.1 Deskripsi.....	9
2.3.2 Habitat	10

2.3.3 Morfologi	11
2.3.4 Metabolit Sekunder Liken.....	11
2.3.5 Penelitian Terkait Liken sebagai Antibakteri.....	12
2.4 Pemisahan dan Pemurnian Senyawa Metabolit Sekunder Liken.....	14
2.4.1 Ekstraksi	14
2.4.2 Isolasi	15
2.5 Karakterisasi Senyawa	16
2.5.1 Spektrometri Massa.....	16
2.5.2 <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (NMR).....	17
2.6 Uji Aktivitas Antibakteri.....	18
BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN	19
3.1 Jenis Penelitian.....	19
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	19
3.3 Alat dan Bahan.....	19
3.3.1 Alat	19
3.3.2 Bahan.....	20
3.4 Variabel Penelitian	20
3.4.1 Variabel Bebas	20
3.4.2 Variabel Terikat.....	20
3.4.3 Variabel Terkendali.....	21
3.5 Definisi Operasional	21
3.6 Prosedur Penelitian	22
3.6.1 Determinasi Liken	22
3.6.2 Pembuatan Simplisia dan Serbuk Liken <i>P. aurulenta</i>	23
3.6.3 Pembuatan Ekstrak Metanol Liken <i>P. aurulenta</i>	23
3.6.4 Preparasi Sampel Isolasi.....	23
3.6.5 Pengembangan Metode Isolasi Senyawa Mayor Liken	24
3.6.6 Isolasi Senyawa Mayor Liken <i>P. aurulenta</i>	24
3.6.7 Pemeriksaan Kemurnian Senyawa Isolat	24
3.6.8 Uji Aktivitas Antibakteri	25
3.6.9 Karakterisasi Senyawa	29

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	30
4.1 Determinasi Spesies.....	30
4.2 Ekstraksi dan Isolasi Liken <i>P. aurulenta</i>	30
4.3 Karakterisasi Senyawa.....	33
4.3.1 Analisis Spektra <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (NMR)	33
4.3.2 Analisis Spektra Spektrometri Massa (MS).....	34
4.4 Uji Aktivitas Antibakteri	43
BAB 5. PENUTUP.....	47
5.1 Kesimpulan.....	47
5.2 Saran	47
DAFTAR PUSTAKA	48
LAMPIRAN.....	56

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Berbagai penelitian terkait aktivitas antibakteri dari liken	13
Tabel 4.1 Perbandingan data ^1H dan ^{13}C NMR senyawa mayor <i>P. aurulenta</i> dengan hasil prediksi perangkat lunak.....	40
Tabel 4.2 Perbandingan data ^1H dan ^{13}C NMR senyawa mayor <i>P. aurulenta</i> dengan Literatur (Oh dkk., 2018).....	41
Tabel 4.3 Presentase penghambatan ekstrak metanol liken <i>P. aurulenta</i> terhadap pertumbuhan <i>S. aureus</i>	45



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1 Struktur dinding sel bakteri	6
Gambar 2.2 Morfologi <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	7
Gambar 2. 3 Sistem simbiosis pada liken	9
Gambar 2.4 <i>P. aurulenta</i>	10
Gambar 2.5 Berbagai morfologi liken	11
Gambar 2.6 Beberapa struktur metabolit sekunder liken.....	12
Gambar 3.1 Skema Penelitian	22
Gambar 3.2 Desain <i>microplate</i>	28
Gambar 4.1 Liken <i>Parmelia aurulenta</i> Tuck.....	30
Gambar 4.2 Profil kromatogram metanol liken <i>P. aurulenta</i> dengan kondisi analisis optimum	32
Gambar 4.3 Kromatogram uji kemurnian isolat senyawa mayor liken <i>P. aurulenta</i> dengan kondisi analisis optimum.....	33
Gambar 4.4 Spektra ¹ H-NMR senyawa mayor liken <i>P. aurulenta</i>	34
Gambar 4.5 Spektra DEPT-135 ¹³ C-NMR senyawa mayor liken <i>P. aurulenta</i> ...	35
Gambar 4.6 Spektra gHSQC senyawa mayor liken <i>P. aurulenta</i>	36
Gambar 4.7 Analisis spektra gHMBC senyawa mayor liken <i>P. aurulenta</i>	37
Gambar 4.8 Tahapan penyusunan fragmen struktur senyawa mayor liken <i>P. aurulenta</i> berdasarkan analisis Spektra NMR.	39
Gambar 4.9 Korelasi antara proton dengan karbon (gHMBC) dari struktur molekul senyawa mayor <i>P. aurulenta</i>	39
Gambar 4.10 Struktur senyawa 2'-hydroxy-4'-((2-hydroxy-4-methoxy-6-propylbenzoyl)oxy)-6'-propylbenzoic acid dari liken <i>P. aurulenta</i> .	42
Gambar 4.11 Spektra LRMS senyawa mayor liken <i>P. aurulenta</i>	43

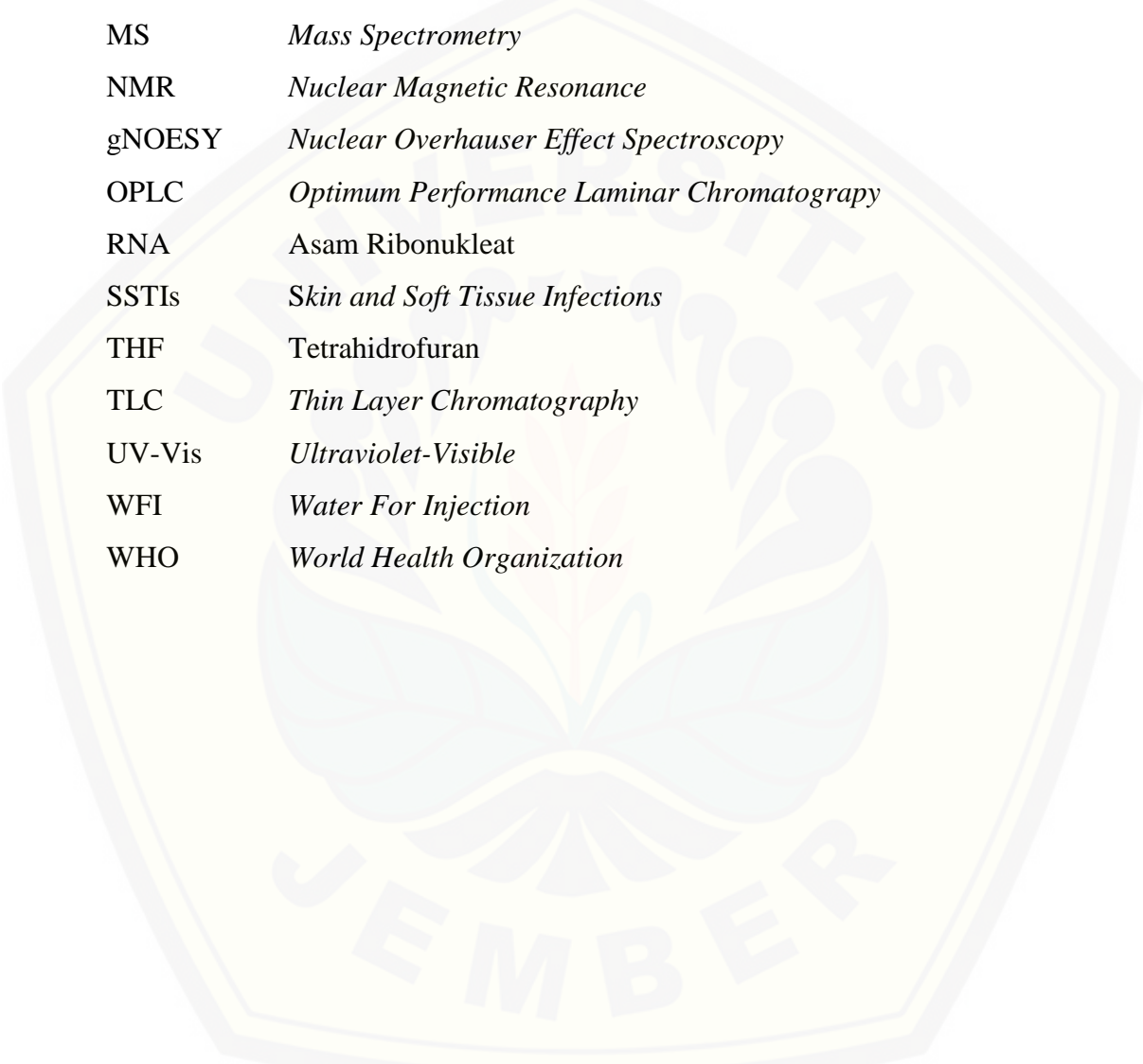
DAFTAR RUMUS

Rumus 1	23
Rumus 2	29



DAFTAR SINGKATAN

1D-NMR	<i>One Dimensional Nuclear Magnetic Resonance</i>
2D-NMR	<i>Two Dimensional Nuclear Magnetic Resonanc</i>
ACN	Asetonitril
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CAMHB	<i>Cation Adjusted Mueller Hinton Broth</i>
CC	<i>Column Chromatography</i>
CFU	<i>Colony Forming Unit</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
¹³ C-NMR	<i>Carbon Nuclear Magnetic Resonance</i>
Co-ADD	<i>Community for Open Antimicrobial Drug Discovery</i>
gCOSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DMSO	Dimetil Sulfoksida
DNA	Asam Deoksiribonukleat
ESI-MS	<i>Electrospray Ionization-Mass Spectrometry</i>
GC	<i>Gas Chromatography</i>
GPC	<i>Gel Permeation Chromatography</i>
gHMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
¹ H-NMR	<i>Proton Nuclear Magnetic Resonance</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HPTLC	<i>High Performance Thin Layer Chromatography</i>
gHSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
IC ₅₀	<i>Inhibitory Concentration 50</i>
LAF	<i>Laminar Air Flow</i>
LC-MS	<i>Liquid Cromatogaphy-Mass Spectrometry</i>
LRMS	<i>Low Resolution Mass Spectrometry</i>
MBC	<i>Minimum Bactericidal Concentration</i>
MeOH	Metanol
MHA	Mueller Hinton Agar



MHB	Mueller Hinton Broth
MHz	Megahertz
MIC	<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>
MPa	Megapascal
MRSA	<i>Methicillin Resistant Staphylococcus aureus</i>
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
gNOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
OPLC	<i>Optimum Performance Laminar Chromatography</i>
RNA	Asam Ribonukleat
SSTIs	<i>Skin and Soft Tissue Infections</i>
THF	Tetrahidrofuran
TLC	<i>Thin Layer Chromatography</i>
UV-Vis	<i>Ultraviolet-Visible</i>
WFI	<i>Water For Injection</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Perhitungan Rendemen Ekstrak Metanol Liken <i>P. aurulenta</i>	56
Lampiran 2. Profil Kromatogram Ekstrak Metanol Liken <i>P. aurulenta</i> dengan kolom Semi-Preparatif HPLC.....	57
Lampiran 3. Kromatogram optimasi metode isolasi	59
Lampiran 4. Perhitungan rendemen isolat	63
Lampiran 5. Data <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (NMR).....	64
Lampiran 6. Spektra LRMS dari Senyawa Mayor Liken <i>P. aurulenta</i>	69
Lampiran 7. Perhitungan Pembuatan Media CAMHB	70
Lampiran 8. Perhitungan Konsentrasi Gentamisin sebagai Kontrol Positif dalam Uji Aktivitas Antibakteri.....	73
Lampiran 9. Perhitungan Konsentrasi Ekstrak Metanol Liken <i>P. aurulenta</i> dalam Uji Aktivitas Antibakteri	74
Lampiran 10. Data Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Liken <i>P. aurulenta</i>	75
Lampiran 11. Analisis Data Hasil Uji Aktivitas Antibakteri	77

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit infeksi merupakan penyakit yang disebabkan oleh mikroorganisme patogen yaitu bakteri, virus, parasit, dan jamur yang menjadi penyebab utama dari morbiditas dan mortalitas dalam sebagian besar sejarah kehidupan manusia (Yanling dkk., 2013). Pada tahun 2016 *World Health Organization* (WHO) menyebutkan bahwa terdapat tiga penyakit infeksi yang termasuk dalam sepuluh penyebab kematian utama di seluruh dunia. Ketiga penyakit tersebut adalah infeksi saluran pernapasan bawah yang menyebabkan 3 juta kematian, penyakit diare yang menyebabkan 1,4 juta kematian, dan tuberkulosis yang menyebabkan 1,3 juta kematian (WHO, 2018). Penyakit infeksi banyak terjadi di negara-negara berpenghasilan rendah daripada negara-negara berpenghasilan tinggi (WHO, 2012).

Antibiotik merupakan obat yang digunakan untuk mencegah dan mengatasi penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri. Antibiotik dikenal sebagai obat yang ampuh pada pertengahan abad ke-20. Pada tahun 1950-1970 dikenal sebagai era keemasan untuk penemuan kelas antibiotik baru (Zaman, 2017). Penggunaan antibiotik yang tidak tepat dan berlebihan menyebabkan terjadinya perkembangan resistensi bakteri terhadap antibiotik (Tegos, 2012). Saat ini, resistensi antibiotik menjadi masalah yang nyata dan terus meningkat. Salah satu bakteri patogen yang mengalami peningkatan resistensi adalah *Staphylococcus aureus*.

S. aureus merupakan penyebab utama dari infeksi nosokomial dan komunitas (Goldman dan Green, 2015). Beberapa kondisi penyakit yang disebabkan oleh infeksi *S. aureus* diantaranya bakteremia, infeksi endokarditis, pneumonia, infeksi kulit dan jaringan lunak serta osteomyelitis (Dayan dkk., 2016). Pada awalnya, penyakit infeksi yang disebabkan oleh *S. aureus* telah diterapi menggunakan penisilin dan turunannya, salah satu diantaranya adalah metisilin (Rayner dan Munckhof, 2005). Resistensi terhadap antibiotik dapat terjadi secara cepat pada *S. aureus* (Otto, 2012). Salah satu strain *S. aureus* yang mengalami

resistensi dikenal sebagai *methicillin resistant S. aureus* (MRSA) (Grema dkk., 2015). Diketahui bahwa antara 13-74% dari kasus infeksi karena *S. aureus* di seluruh dunia adalah MRSA (Köck dkk., 2010). Kondisi resistensi pada *S. aureus* menyebabkan antibiotik yang dapat digunakan dalam pilihan terapi menjadi lebih sedikit sehingga perlu dilakukan upaya penemuan alternatif antibiotik atau antibakteri baru.

Sebagian besar antibakteri yang digunakan saat ini berasal dari bahan alam yang dalam eksplorasinya meliputi bahan alam seperti, tanah, bakteri, jamur, dan tumbuhan tingkat tinggi. Dalam perkembangan antibakteri, penemuan antibakteri penisilin berasal dari bahan alam berupa jamur yang termasuk dalam Kingdom Fungi oleh Alexander Fleming pada tahun 1928 (Gould, 2016). Jamur menjadi salah satu komponen simbiosis dalam pembentukan liken. Hal tersebut membuka peluang untuk melakukan penelitian mengenai aktivitas antibakteri yang dimiliki oleh liken.

Liken merupakan organisme yang terbentuk dari simbiosis antara jamur sebagai mikobion, yang pada umumnya ascomycetes, dan alga hijau uniseluler atau cyanobacteria sebagai fotobion (Armaleo dkk., 2019). Berdasarkan penelitian yang telah ada, liken mengandung metabolit sekunder yang terdiri atas beberapa senyawa diantaranya, turunan asam amino, alkohol gula, asam-asam alifatik, lakton makrolitik, senyawa aromatis monosiklik, *quinines*, *chromones*, *xanthones*, dibenzofuran, depsida, depsidon, depson, terpenoid, steroid, karotenoid, dan difenil eter (Nayak, 2016). Metabolit sekunder yang terdapat dalam beberapa liken dilaporkan memiliki peranan dalam aktivitas biologis dari liken tersebut seperti, antimikoba dan antikanker (Nugraha dkk., 2019). Sejumlah spesies liken telah diteliti terkait aktivitas antibakterinya dan sejumlah metabolit liken diketahui memiliki aktivitas terhadap bakteri gram positif dan mycobacteria (Jha dkk., 2017). Dalam penelitian yang dilakukan oleh Pompillo dkk, 2013 diketahui bahwa sejumlah metabolit sekunder dalam liken dapat dipertimbangkan sebagai *lead compounds* dalam terapi infeksi *S. aureus* pada pasien *cystic fibrosis* (Pompilio dkk., 2013)

Terdapat lebih dari 20.000 spesies liken diseluruh dunia (Sesal dkk., 2016) yang dapat tumbuh pada batu, pasir gurun, tanah, kayu mati, kulit pohon yang masih hidup, tulang hewan, dan logam berkarat (Desbenoit dkk., 2004). Indonesia memiliki spesies liken yang beragam karena merupakan negara kepulauan yang memiliki biodiversitas terbesar kedua setelah Brazil. Dari keseluruhan spesies liken yang ada di Indonesia hanya sedikit yang telah diinvestigasi (Nugraha dkk., 2020)

Pada penelitian ini digunakan liken *P. aurulenta* Tuck. sebagai sampel yang berasal dari famili Parmeliaceae. Pada penelitian yang dilakukan oleh Mehmet dkk (2007) dari Departemen Biologi Universitas Anadolu Turki liken *Parmelia sulcata* dengan kandungan senyawa asam salazinat yang berasal dari famili Parmeliaceae memiliki aktivitas antibakteri, salah satunya terhadap *S. aureus*. Hal tersebut yang kemudian mendasari adanya kemungkinan bahwa liken *P. aurulenta* juga memiliki aktivitas antibakteri. Saat ini belum ada penelitian mengenai aktivitas antibakteri liken *P. aurulenta* terhadap bakteri *S. aureus*, sehingga penelitian ini dapat memberikan informasi dalam penemuan senyawa antibakteri baru.

Berdasarkan uraian tersebut, eksplorasi liken dan bioaktivitasnya di Indonesia menjadi penting untuk dilakukan. Pada penelitian ini dilakukan isolasi dan karakterisasi dari senyawa mayor dari liken *P. aurulenta* Tuck. serta uji aktivitas antibakteri dari ekstrak metanol liken *Parmelia aurulenta* Tuck. terhadap *S. aureus* menggunakan metode mikrodilusi dengan pengujian konsentration tunggal. Isolasi senyawa dilakukan dengan HPLC dan selanjutnya senyawa yang berhasil diisolasi dikarakterisasi menggunakan ESI-MS, $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian diatas, masalah yang dapat dirumuskan pada penelitian ini antara lain:

1. Berapakah % penghambatan ekstrak metanol liken *P. aurulenta* Tuck. terhadap bakteri *S. aureus*?
2. Bagaimanakah karakterisasi isolat dari Liken *P. aurulenta* Tuck?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan yang ingin dicapai pada penelitian ini antara lain:

1. Mengetahui % penghambatan ekstrak metanol liken *P. aurulenta* Tuck. terhadap bakteri *S. aureus*
2. Mendapatkan isolat dan karakterisasi senyawa yang diisolasi dari liken *P. aurulenta* Tuck.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang ingin diperoleh dari penelitian ini diantaranya:

1. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai aktivitas antibakteri dari ekstrak metanol liken *P. aurulenta* Tuck. terhadap bakteri *S. aureus*
2. Penelitian ini diharapkan dapat memberi informasi mengenai senyawa yang terdapat dalam liken *P. aurulenta* Tuck.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

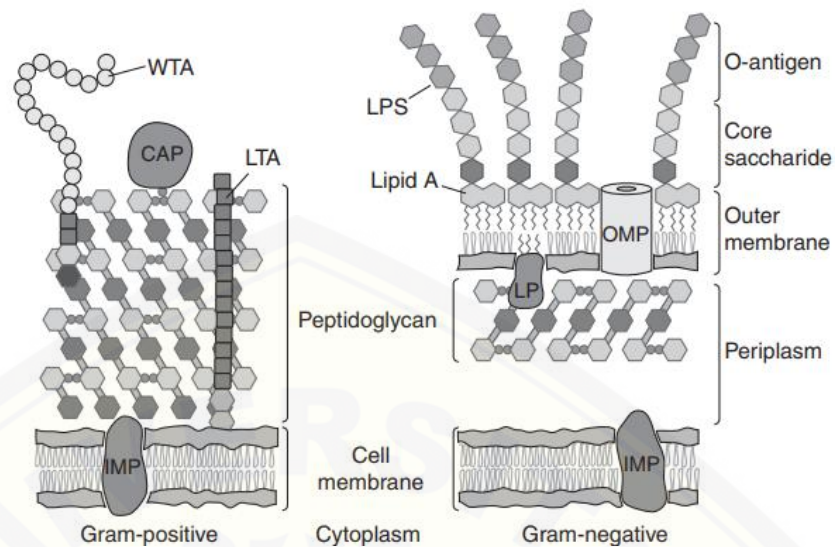
2.1 Penyakit Infeksi

2.1.1 Infeksi Bakteri

Penyakit infeksi merupakan penyakit yang disebabkan oleh mikroorganisme patogen yaitu bakteri, virus, parasit, dan jamur yang menjadi penyebab utama dari morbiditas dan mortalitas dalam sebagian besar sejarah kehidupan manusia (Yanling dkk., 2013.). Infeksi yang disebabkan oleh bakteri menjadi suatu hal yang dapat mengancam kesehatan manusia. Infeksi oleh bakteri bertanggung jawab terhadap jutaan kematian setiap tahunnya di seluruh dunia (Khameneh dkk., 2019). Penyebaran infeksi dapat terjadi melalui beberapa cara seperti, kontak secara langsung, pembawa yang umum contohnya air atau makanan yang terkontaminasi, vektor, dan transmisi melalui udara (Drexler, 2010).

Penyakit infeksi karena bakteri dapat diakibatkan oleh bakteri gram positif dan gram negatif. Bakteri gram negatif memiliki dinding sel yang tersusun atas peptidoglikan tipis dan membran luar yang tersusun atas lipopolisakarida. Bakteri gram positif memiliki dinding sel yang tersusun atas lapisan peptidoglikan yang lebih tebal dari bakteri gram negatif dan memiliki polimer anionik panjang yaitu disebut asam teikoat yang berada pada lapisan peptidoglikan (Silhavy dkk., 2010). Perbedaan komponen penyusun dinding sel ini yang menyebabkan munculnya perbedaan warna saat dilakukan pewarnaan gram dengan metode yang dikembangkan oleh Hans Christian Gram pada tahun 1884. Susunan dinding sel bakteri gram positif dan gram negatif tertera pada gambar 2.1.

Bakteri gram positif menjadi salah satu penyebab infeksi klinis yang paling umum (Menichetti, 2005). Mortalitas akibat infeksi dalam darah yang disebabkan oleh infeksi bakteri gram positif meningkat sebesar 78% dalam dua dekade terakhir (NNIS, 2000). Beberapa genus bakteri gram positif yang bersifat patogen antara lain, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Clostridia*, *Listeria*, dan *Corynebacterium* (Sizar dan Unakal, 2019).



Gambar 2.1 Struktur dinding sel bakteri (Sumber: Silhavy dkk., 2010)

Beberapa spesies bakteri gram positif dapat menyebabkan penyakit infeksi. *S. aureus* dapat menyebabkan penyakit inflamasi seperti infeksi kulit, keracunan makanan, pneumonia, endokarditis, sepsis arthritis, osteomyelitis, dan abses. *Staphylococcus epidermidis* dapat menginfeksi alat-alat prostetik dan kateter intravena. *Staphylococcus saprophyticus* menjadi penyebab umum kedua dari infeksi saluran kemih tanpa komplikasi. *Streptococcus pneumoniae* menyebabkan otitis media, pneumonia, sinusitis, dan meningitis. Bakteri gram positif juga dapat menyebabkan penyakit infeksi yang lain seperti infeksi piogenik, infeksi toksigenik, dan infeksi imunogenik (Sizar dan Unakal, 2019). Infeksi yang disebabkan oleh bakteri gram positif saat ini banyak diperhatikan karena adanya kondisi *multidrug resistant gram positive bacteria* yang menjadi masalah kesehatan utama (Woodford dan Livermore, 2009).

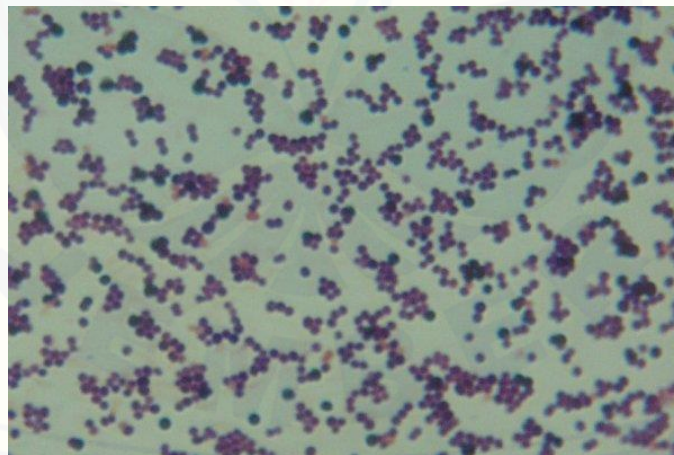
2.1.2 *Staphylococcus aureus*

S. aureus banyak ditemukan sebagai flora normal pada saluran pernapasan dan kulit manusia (Madigan dkk., 2015). *S. aureus* dapat membentuk koloni pada saluran hidung dan pada bagian aksila (Foster, 1996). *S. aureus* juga ditemukan pada bagian faring, perineum, dan kulit yang utamanya ada pada bagian tangan,

dada, dan abdomen (Otto dkk., 2010). Berikut merupakan taksonomi dari *S. aureus* (VetBact.org, 2018).

Filum : Firmicutes
Kelas : Bacilli
Ordo : Bacillales
Famili : Staphylococcaceae
Genus : Staphylococcus
Spesies : *Staphylococcus aureus*
Sub-spesies : aureus

Bakteri *S. aureus* merupakan bakteri gram positif yang dalam pewarnaan gram akan menghasilkan warna ungu dan secara morfologi makroskopis memiliki ukuran diameter 2-3 mm, buram, dan koloninya berwarna putih atau kuning. Memiliki bentuk *low convex* dengan tepian yang halus. Secara morfologi mikroskopis *S. aureus* berbentuk cocci atau bulat (Gambar 2.2) dan non-motil yang berkelompok serta tidak membentuk spora (VetBact.org, 2018). *S. aureus* bersifat aebik fakultatif dan dapat tumbuh pada rentang temperatur 18-40 °C.



Gambar 2.2 Morfologi Staphylococcus aureus ATCC 25923 (Sumber: VetBact.org, 2018)

S. aureus merupakan penyebab utama terjadinya infeksi nosokomial dan infeksi yang diperoleh dalam komunitas (Goldman dan Green, 2015). Genus Staphylococcus termasuk di dalamnya *S. aureus* umumnya menyebabkan infeksi pada kulit, luka, dan pneumonia. Infeksi yang disebabkan oleh *S. aureus* sebagian disebabkan oleh transmisi bakteri pada flora normal individu yang terinfeksi tanpa

gejala kepada individu yang rentan terkena infeksi (Madigan dkk., 2015). Beberapa kondisi penyakit lain yang disebabkan oleh infeksi *S. aureus* diantaranya bakteremia, infeksi endokarditis, osteomyelitis, dan *skin and soft tissue infections* (SSTIs) (Dayan dkk., 2016).

S. aureus memiliki sejumlah faktor virulensi yang dapat digunakan untuk menyebabkan suatu penyakit pada manusia. Faktor-faktor virulensi tersebut diantaranya, α -toksin, β -toksin, γ -toksin, δ -toksin, protein-A, dan protein koagulase (VetBact.org, 2018). Setiap faktor virulensi memiliki peranan yang khusus dalam patogenesis penyakit yang disebabkan oleh *S. aureus*.

Beberapa strain dari *S. aureus* mengalami perkembangan resistensi dan selanjutnya dikenal sebagai *methicillin resistant S. aureus* (MRSA). Kondisi infeksi yang disebabkan oleh MRSA masih menjadi masalah kesehatan utama di dunia (Hassoun dkk., 2017). Salah satu penyebab terjadinya infeksi adalah karena mutasi yang dapat mengubah sisi ikatan obat dengan molekul target dengan meningkatkan ekspresi pompa efluks endogen (Foster, 2017).

2.2 Antibakteri

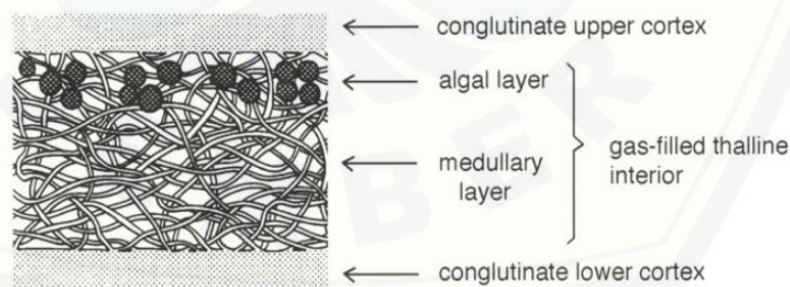
Antibakteri merupakan senyawa yang dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri (Yanling dkk., 2013). Antibakteri dapat memiliki efek sebagai bakteristatik maupun bakterisidal. Efek bakteristatik dikatakan sebagai proses yang reversibel dan dapat kembali ketika antibakteri dihilangkan atau dikenal dengan proses penghambatan pertumbuhan bakteri. Efek bakterisidal merupakan proses yang ireversibel dan merusak struktur sel yang vital pada bakteri atau dikenal sebagai efek yang membunuh bakteri (Denyer, 1996). Antibakteri dikenal sebagai senyawa yang ampuh karena secara selektif menangani mikroba yang bertanggung jawab menyebabkan suatu penyakit dan di sisi lain tidak mempengaruhi sel inang yang terinfeksi (Zaman dkk., 2017). Antibakteri diklasifikasikan berdasarkan mekanisme aksinya dalam menghambat pertumbuhan atau membunuh bakteri. Beberapa mekanisme aksi senyawa antibakteri antara lain menghambat sintesis dinding sel seperti golongan β -Laktam. Mekanisme yang selanjutnya yaitu dengan

menghambat biosintesis protein seperti golongan aminoglikosida, tetrasiklin, makrolida, dan kloramfenikol. Mekanisme yang ketiga yaitu dengan menghambat replikasi DNA seperti golongan quinolon. Mekanisme yang keempat yaitu menghambat metabolisme asam folat seperti sulfonamid dan trimetoprim (Kapoor dkk., 2017).

2.3 Liken

2.3.1 Deskripsi

Liken merupakan organisme yang terbentuk dari simbiosis (Gambar 2.3) antara jamur sebagai mikobion dengan alga hijau uniseluler atau sianobakteria sebagai fotobion (Armaleo dkk., 2019). Jamur sebagai mikobion meningkatkan penyerapan air dan nutrisi yang diperlukan untuk fotosintesis bagi alga atau sianobakteri serta melindungi fotobion dari intensitas paparan cahaya berlebih. Sementara itu, alga atau sianobakteri sebagai fotobion akan melakukan fotosintesis yang menghasilkan senyawa turunan karbon yang diperlukan oleh jamur (Zambare dkk., 2012). Mikobion pada sebagian besar berasal dari Ascomycota dan hanya sebagian kecil yang berasal dari Basidiomycota (Papazi dkk., 2015). Dalam simbiosis pada liken, 85% fotobion berasal dari alga hijau, 10% berasal dari sianobakteria, dan 4% berasal dari keduanya (Papazi dkk., 2015).



Gambar 2.3 Sistem simbiosis pada liken (Sumber: Honegger, 2015)

Dalam penelitian ini digunakan liken *P. aurulenta* Tuck yang memiliki taksonomi sebagai berikut (Col, 2011).

Kingdom : Fungi

Filum : Ascomycota

Kelas : Ascomycetes
Ordo : Lecanorales
Famili : Parmeliaceae
Genus : Parmelia
Spesies : *Parmelia aurulenta*

Liken *P. aurulenta* memiliki bentuk morfologis foliose (Fahselt dan Miranda, 1973) dengan lebar talus 4-10 cm, permukaan bagian atas berwarna hijau pucat hingga abu-abu kebiruan, bentuk tepinya farinose hingga granular, dan permukaan bagian bawah berwarna hitam dengan sedikit warna coklat (Nash dkk., 2002). Bentuk morfologi liken *P. aurulenta* dari Kloncing Bondowoso terdapat pada gambar 2.4.



Gambar 2.4 *P. aurulenta* Lichenportal.org, 2002 (kanan) dan dokumentasi pribadi (kiri)

2.3.2 Habitat

Liken dapat hidup pada beragam ekosistem yang menjadikan liken mendominasi 8% dari daratan di Bumi (Nugraha dkk., 2019). Telah diketahui bahwa 20.000 spesies liken yang ada di dunia tersebar pada ekosistem tundra artik, antartika, alpine, steppe, dan gurun. Sebagian besar liken memiliki toleransi yang tinggi untuk bertahan hidup pada kondisi temperatur ekstrem dan pada ketinggian yang beragam (Honegger, 2015). Liken dapat tumbuh pada batu, pasir gurun, tanah, kayu mati, kulit pohon yang masih hidup, tulang hewan, dan logam berkarat (Desbenoit dkk., 2004).

Liken memiliki peranan penting dalam ekosistem. Hal ini dikarenakan beberapa jenis liken dapat menyimpan air dalam waktu yang lama sehingga dapat

menyediakan kelembaban tanah yang dibutuhkan untuk tumbuhnya tumbuhan lain (Tanton dan Rmesto, 2014). Selain itu, pigmentasi pada liken dapat menjadi indikator dari perubahan kondisi lingkungan (Asplund dan Wardle, 2016).

2.3.3 Morfologi

Liken memiliki morfologi yang beragam sebagai manifestasi dari sistem simbiosis antara mikobion dan fotobion. Sebanyak 90-95% bagian tubuh liken yang disebut sebagai talus atau blastema terdiri dari bagian massa kenyal dan mudah hancur yang tersusun dari filamen halus jamur atau hifa, sementara lapisan yang lain tersusun dari alga (Podterob, 2008).

Berdasarkan morfologinya liken terbagi menjadi tiga kategori utama diantaranya *crustose*, *foliose*, *fruticose* (Gambar 2.3). Liken *crustose* memiliki talus yang melekat erat pada tempat tumbuhnya, talus dari kategori ini biasanya hanya memiliki struktur seperti akar yang sedikit. Liken *foliose* biasa disebut sebagai liken yang memiliki struktur seperti daun karena pada liken ini bagian talus tidak melekat erat pada tempat tumbuhnya dan dapat secara mudah dipisahkan dari tempat tumbuhnya. Pada liken *fruticose*, hanya bagian tertentu pada talus yang melekat pada tempat tumbuhnya (Nayaka, 2014).



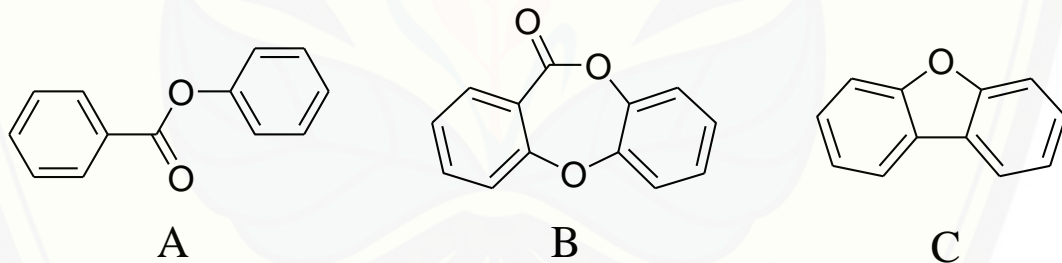
Gambar 2.5 Berbagai morfologi liken *Crustose* (Kiri), *Foliose* (Tengah), dan *Fruticose* (Kanan) (sumber: dokumen *Drug Utilisation and Discovery Research Group*)

2.3.4 Metabolit Sekunder Liken

Metabolit yang dihasilkan oleh liken terbagi menjadi metabolit primer dan metabolit sekunder. Metabolit primer yang dihasilkan oleh liken umumnya dihasilkan oleh mikobion dan tidak spesifik serta memiliki peranan dalam metabolisme dan struktural sel, contoh metabolit primer yang dihasilkan yaitu,

protein, asam amino, karotenoid, polisakarida dan vitamin (Kosanić dan Ranković, 2015). Metabolit sekunder yang dihasilkan oleh liken umumnya digunakan untuk pertahanan liken terhadap kondisi tertentu (Nayak, 2016). Metabolit sekunder pada liken diproduksi oleh mikobion dan disimpan pada bagian korteks dalam bentuk kristal kecil pada permukaan hifa (Molnar dan Farkas, 2010). Fotobion juga dapat mempengaruhi metabolisme sekunder dari mikobion.

Metabolit sekunder liken terdiri atas beberapa kelas senyawa diantaranya, turunan asam amino, alkohol gula, asam-asam alifatik, lakton makrolitik, senyawa aromatis monosiklik, *quinines*, *chromones*, *xanthones*, dibenzofuran, depsida, depsidon, depson, terpenoid, steroid, karotenoid, dan difenil eter (Nayak, 2016). Metabolit sekunder spesifik yang dihasilkan oleh liken adalah depside, depsidone, dan dibenzofuran (Nugraha dkk., 2019). Kerangka struktur metabolit sekunder ditunjukkan pada gambar 2.4. Diketahui bahwa metabolit sekunder liken memiliki aktivitas biologis yang luas seperti, antibakteri, antivirus, analgesik, antiinflamasi, antipiretik, antiproliferatif, dan efek sitotoksik (Zambare dkk., 2012)



Gambar 2.6 Beberapa struktur metabolit sekunder liken A) *Depside* B) *Depsidone* C) *Dibenzofuran*

2.3.5 Penelitian Terkait Liken sebagai Antibakteri

Metabolit sekunder liken telah diteliti dan memiliki beragam aktivitas biologis. Salah satu aktivitas biologis liken yaitu antibakteri. Telah dilakukan sejumlah penelitian mengenai aktivitas antibakteri liken. Beberapa penelitian tersebut tertera pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Berbagai penelitian terkait aktivitas antibakteri dari liken

Liken	Metabolit sekunder	Aktivitas
Usnea, Evernia, Lecanora, Cladonia, and Parmelia	Senyawa <i>usric acid</i>	Memberikan penghambatan terhadap sintesis RNA dan DNA dari sejumlah bakteri gram positif seperti <i>Bacillus subtilis</i> dan <i>Staphylococcus aureus</i> (Macia, 2014)
<i>Parmotrema ravum</i>	Senyawa aurasperon A dan pirofen	Senyawa aurasperon A memiliki aktivitas antibakteri terhadap <i>E. coli</i> dengan IC ₅₀ sebesar 112 µg/mL. Senyawa pirofen memiliki aktivitas antibakteri terhadap 50% organisme uji pada manusia. (Padhi dkk., 2019)
<i>Evernia mesomorpha</i>	Senyawa <i>divaricatic acid</i>	Memiliki aktivitas terhadap sejumlah bakteri gram positif, seperti <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Streptococcus mutans</i> , dan <i>Enterococcus faecium</i> dengan rentang nilai MIC sebesar 7.0 hingga 64.0 µg/mL (Oh dkk., 2018)
<i>Usnea longissima</i>	Senyawa 5-etiliden-7-formil-6,7-dihidroksi metil hept-6-enoat	Memiliki aktivitas terhadap bakteri <i>E. coli</i> dan <i>S. Typhi</i> pada konsentrasi 100, 250, 500, dan 1000 ppm. Tidak memiliki aktivitas terhadap <i>S. aureus</i> (Muntu dan Nurdin, 2016)
<i>Xanthoria Parietina</i>	Senyawa asam sekikaat dan asam 5-klorosekikaat	Senyawa asam sekikaat dan asam 5-klorosekikaat menunjukkan aktivitas antibakteri sedang terhadap <i>Bacillus subtilis</i> dengan zona hambat sebesar 5 mm. (Dias dan Urban, 2009)
<i>Graphis tetralocularis</i>	Senyawa acremonidin E, graphisins A dan B	Senyawa acremonidin E memiliki aktivitas terhadap <i>Mycobacterium tuberculosis</i> dengan MIC sebesar 50 µg/ mL. Senyawa graphisins A dan B tidak memiliki aktivitas dalam uji. (Pittayakhajonwut dkk., 2015)
<i>Ramalina terebrata</i>	Senyawa asam usnic, usimin A, usimin B, usimin C, dan ramalin,	Memiliki aktivitas terhadap bakteri <i>B. subtilis</i> dengan rentang nilai MIC 1 hingga 26 µg/mL (Paudel dkk. , 2010)

2.4 Pemisahan dan Pemurnian Senyawa Metabolit Sekunder Liken

2.4.1 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan suatu proses penarikan senyawa yang terkandung dalam tumbuhan maupun hewan (Mandal, 2015). Ekstraksi menjadi langkah awal yang krusial dalam analisis tumbuhan obat karena diperlukan ekstrak dari senyawa yang diinginkan pada tumbuhan untuk selanjutnya dipisahkan dan dikarakterisasi (Sasidharan dkk., 2011). Ekstraksi menggunakan pelarut merupakan metode yang paling umum digunakan. Proses ekstraksi ini terjadi melalui penetrasi pelarut ke dalam sel, kemudian senyawa yang ada di dalam sel akan larut dalam pelarut, kemudian senyawa terlarut akan berdifusi keluar dari sel dan didapatkan ekstrak dari senyawa yang diinginkan (Zhang dkk., 2018).

Terdapat beberapa metode ekstraksi, diantaranya maserasi, perkolasi, dekokta, ekstraksi refluks, sohlletasi, ekstraksi dengan ultrasonikasi, ekstraksi dengan gelombang mikro, dan distilasi (Zhang dkk., 2018). Dalam penelitian ini digunakan metode maserasi dengan bantuan pengadukan menggunakan *magnetic stirrer*. Metode maserasi dipilih karena merupakan metode yang sangat sederhana dan tidak memerlukan alat yang khusus, selain itu dikarenakan pada penelitian ini ekstraksi dilakukan pada bahan alam yang belum diketahui kandungan senyawanya dan dikhawatirkan memiliki senyawa yang bersifat termolabil. Kekurangan dari metode maserasi yaitu membutuhkan waktu yang lama dan kurang efisien. Pengadukan dilakukan untuk meningkatkan efisiensi ekstraksi karena dapat meningkatkan kontak antara pelarut dengan sampel (Azmir dkk., 2013).

Pemilihan pelarut merupakan aspek yang penting dalam proses ekstraksi. Hal yang perlu menjadi pertimbangan dalam pemilihan pelarut yaitu, selektivitas, kelarutan, biaya, dan keamanan. Pelarut dipilih berdasarkan kelarutan senyawa yang akan diekstraksi (*like dissolve like*). Metanol dan etanol merupakan pelarut universal dalam penelitian fitokimia (Zhang dkk., 2018). Pada penelitian ini digunakan metanol sebagai pelarut ekstraksi.

2.4.2 Isolasi

Isolasi merupakan suatu metode untuk memisahkan atau mengambil senyawa bahan alam dari suatu campuran menggunakan pelarut yang sesuai (Sarker dkk., 2006). Terdapat beberapa metode isolasi diantaranya, *Thin Layer Chromatography* (TLC), *Column Chromatography* (CC), *Gas Chromatography* (GC), *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), *High Performance Thin Layer Chromatography* (HPTLC), *Optimum Performance Laminar Chromatography* (OPLC) (Rasul, 2019). Dalam Penelitian ini dilakukan isolasi menggunakan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC)

Isolasi senyawa bahan alam dengan menggunakan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) merupakan teknik yang digunakan secara luas. Isolasi senyawa menggunakan HPLC dilakukan dengan mempertimbangkan beberapa hal seperti fase gerak yang sesuai, kecepatan alir, kolom dan detektor yang sesuai untuk mendapatkan pemisahan yang optimum, sebab senyawa tertentu memiliki kecepatan migrasi yang berbeda pada kolom dan fase gerak tertentu (Sasidharan dkk., 2011). HPLC modern menggunakan fase diam bersifat non-polar dan fase gerak yang bersifat polar (Rasul, 2019).

Dalam penelitian ini digunakan kolom semi preparatif HPLC. Istilah preparatif dalam konteks pemisahan dan isolasi senyawa dari matriks yang kompleks mengacu pada proses skala besar dan biasanya digunakan kolom yang besar, *sample loading* yang besar serta kecepatan alir yang tinggi dengan tujuan untuk mengisolasi atau memurnikan senyawa dengan jumlah yang besar (Latif dkk., 2012). Kolom semi preparatif HPLC memiliki beberapa tipe yaitu *normal phase*, *reversed phase*, dan *gel permeation chromatography* (GPC) yang selanjutnya dipilih berdasarkan kesesuaiannya dengan sifat ekstrak yang akan diisolasi.

Penelitian ini menggunakan *Reversed Phase Prep-HPLC* sehingga fase diam memiliki sifat lebih nonpolar dibandingkan dengan fase gerak. Eluen yang digunakan adalah campuran air dengan pelarut organik yang dapat campur dengan air, contohnya asetonitril (ACN), metanol (MeOH), atau tetrahidrofur (THF) (Latif dkk., 2012). Eluen yang digunakan pada HPLC harus memiliki kriteria

tertentu diantaranya viskositas yang tidak lebih tinggi daripada air, kompatibel terhadap detektor, titik didih yang tidak terlalu rendah, dan merupakan pelarut pro-HPLC.

2.5 Karakterisasi Senyawa

Karakterisasi senyawa dilakukan untuk menentukan struktur molekul dari suatu senyawa. Proses ini melibatkan analisis spektra yang berupa spektrofotometri inframerah, spektrofotometri ultraviolet, spektrometri massa, spektroskopi x-ray, dan spektroskopi resonansi magnetik inti (Balci, 2005). Dalam penelitian ini elusidasi struktur molekul dilakukan dengan menganalisis spektra spektroskopi massa, dan *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR).

2.5.1 Spektrometri Massa

Spektrometri massa memiliki prinsip dasar yaitu menghasilkan ion baik dari senyawa anorganik maupun organik dengan metode yang sesuai. Ion-ion yang diperoleh kemudian dipisahkan sesuai rasio massa dan muatan (m/z) serta dideteksi baik secara kuantitatif maupun kualitatif berdasarkan kelimpahan m/z dari masing-masing ion. Spektrometer massa tersusun atas sumber ion, *mass analyzer*, dan detektor. Pemisahan sampel pada spektrometer massa melalui tahapan pemaparan sampel, penguapan dan ionisasi. Spektrum massa merupakan gambaran dari intensitas puncak yang berhubungan dengan kelimpahan ion dan m/z (Gross, 2011).

Dalam penelitian ini digunakan teknik *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* (LC-MS) yang dilakukan dengan menggabungkan kemampuan pemisahan fisik kromatografi cair (contohnya HPLC) dengan kemampuan analisis dari spektrometer massa (MS). Sampel yang telah dipisahkan dengan kolom HPLC kemudian deteksi oleh instrumen spektrometer massa yang kemudian hasilnya akan dianalisis melalui perbandingan spektra hasil deteksei dengan spektra standar pada komputer yang terhubung dengan instrumen (Pavia, 2009).

Electrospray Ionization-Mass Spectrometry merupakan salah satu teknik untuk menghasilkan ion yang digunakan dalam spektrometri massa. Dalam teknik ini, ion dihasilkan melalui penerapan medan listrik yang kuat terhadap cairan yang

melewati melewati tabung kapiler dengan fluks lemah. Tetesan akan keluar dari ujung pipa kepler pada ruang ionisasi yang selanjutnya akan mengalami diubah menjadi fase gas oleh gas pengering yaitu nitrogen kemudian ditembak dengan energi elektron yang tinggi sehingga dihasilkan ion bermuatan (Pavia, 2009).

2.5.2 *Nuclear Magnetic Resonance (NMR)*

Nuclear Magnetic Resonance NMR merupakan teknik yang sangat berguna dalam identifikasi dan analisis senyawa organik. NMR didasarkan pada *spin* inti dari ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , dan ^{31}P , namun yang umum digunakan adalah ^1H dan ^{13}C . Terdapat dua tipe spektrum NMR spektroskopi yaitu 1D-NMR dan 2D NMR (Balci, 2005). 1D-NMR terdiri dari data ^1H -NMR dan ^{13}C -NMR yang dalam spektranya tersusun atas pergeseran kimia dan intensitas sinyal. 2D-NMR terdiri dari data *Correlation Spectroscopy* (gCOSY), *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy* (gNOESY), *Heteronuclear Single Quantum Coherence* (gHSQC), dan *Heteronuclear Multiple Bond Correlation* (gHMBC) yang dalam spektranya tersusun atas pergeseran kimia dari sistem *homonuclear* dan *heteronuclear* serta intensitas sinyal (Balci, 2005).

^1H -NMR memberikan informasi mengenai intensitas atom hidrogen tiap lingkungan, pergeseran kimia (δ) atom hidrogen, dan gugus yang berdekatan dengan atom hidrogen. ^{13}C -NMR memberikan informasi mengenai pergeseran kimia karbon yang dipengaruhi oleh elektronegativitas gugus yang berikatan dengan karbon tersebut. gCOSY memberikan informasi mengenai proton-proton yang berdekatan pada suatu senyawa. gNOESY memberikan informasi mengenai proton yang berdekatan dalam suatu *space* namun tidak secara langsung terhubung melalui ikatan kimia. gHSQC memberikan informasi mengenai hubungan antara proton dengan karbon dalam satu ikatan gHMBC memberikan informasi mengenai hubungan antara proton dengan karbon yang berjarak 2 hingga 3 ikatan (Balci, 2005).

Pelarut yang digunakan dalam pemeriksaan NMR adalah pelarut dengan viskositas rendah dan pelarut harus mampu melarutkan sampel yang akan dianalisis

serta tidak memberikan sinyal. Pelarut yang umumnya digunakan adalah CCl_4 , CDCl_3 , D_2O , C_6D_6 , CS_2 , dan $(\text{CCl}_3)\text{COO}$ (Silverstain dkk., 1986).

2.6 Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri digunakan sebagai langkah awal untuk pengembangan antibakteri. Sejumlah metode uji aktivitas antibakteri yang umum digunakan ialah difusi dan metode dilusi. Metode *flow cytroflorometric* dan *bioluminescent* merupakan metode yang jarang digunakan karena membutuhkan peralatan yang khusus dan evaluasi lebih lanjut terkait dengan reproduibilitas dan standarisasinya (Balouri, 2015).

Metode mikrodilusi merupakan metode yang digunakan dalam penelitian ini. Metode mikrodilusi merupakan salah satu bagian dari metode dilusi. Metode ini dapat digunakan untuk menentukan *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC), *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dan *Inhibitory Concentration 50* (IC_{50}) dari sampel antibakteri (Misra dan Sahoo, 2012). Metode memiliki keuntungan yaitu volume reagen yang dibutuhkan lebih sedikit dan dapat digunakan untuk uji dengan jumlah bakteri yang besar dalam waktu yang cepat (CLSI, 2015).

Kontrol positif merupakan kelompok kontrol yang diketahui hasilnya. Kontrol positif untuk uji aktivitas antibakteri dalam penelitian ini adalah gentamisin. Gentamisin merupakan antibiotik dengan spektrum luas dan termasuk dalam golongan aminoglikosida. Gentamisin memiliki mekanisme antibakteri dengan menghambat sintesis protein dengan berikatan pada ribosom subunit 30S bakteri. Menurut *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) Gentamisin direkomendasikan dalam pengujian antibakteri terhadap *S. aureus* (CLSI, 2017).

BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Mayor dari Liken *P. aurulenta* Tuck. serta Uji Aktivitas Antibakteri terhadap *S. aureus* ini merupakan penelitian *true experimental*.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Analisis Instrumen Bagian Kimia Fakultas Farmasi Universitas Jember, Laboratorium Kelompok Riset *Drug Utilisation and Discovery Research Group*, Laboratorium *Center of Development of Advance Science and Technology* (CDAST) Universitas Jember, dan University of Wollongong Australia mulai bulan Juli 2019 hingga Januari 2020.

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain neraca analitik (Sartorius), ayakan plastik, blender (Phillips), seperangkat alat gelas (Pyrex), tabung reaksi (Iwaki), rak tabung reaksi, lemari pendingin, lemari asam, *magnetic stirrer* (UC152), vial 15 mL, spatula logam, mikro spatula logam, seperangkat alat destilator, *High Pressure Liquid Chromatography* (HPLC) CECIL CE4300 dengan detektor UV-Vis, rak tabung reaksi, *syringe* 1 mL dan 5mL, membran filter 0.45 µm, SGE 100 µL syringe (*Trajan Scientific and Medical*), ultrasonikator, alat *freeze dry*, *yellow tip*, *blue tip*, eppendorf, jarum ose, pembakar spiritus, , *orbital incubator* (Stuart SI600), *microplate flat bottom 96 wells* (Iwaki), mikropipet (Socorex dan Eppendorf), *12-channel micropipette* (Socorex), *Laminar Air Flow* (THERMO CIENTIFIC SERIES A2), autoklaf (B-ONE), *hot plate* (UC152), vortex (GENIE2), *shacker inkubator* (B-ONE), perangkat lunak ChemDraw Ultra versi 8.0, perangkat

lunak PowerStream, Spektrofotometer Uv-Vis, *microplate reader*, *Electrospray Ionization Mass Spectrometry*, NMR Jeol 400 MHz, perangkat lunak Mnova versi 14.1, dan perangkat lunak SeeMS.

3.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan sebagai sampel dalam pembuatan simplisia pada penelitian ini adalah liken *P. aurulenta* yang diperoleh dari daerah Klonding Bondowoso pada bulan Mei 2019 dan telah dideterminasi di Fakultas Biologi Universitas Gajah Mada. Bahan yang digunakan dalam proses ekstraksi adalah metanol *pro-analysis* (Merck), aluminium foil dan kertas saring *Whatman*. Bahan yang digunakan untuk isolasi senyawa tumbuhan epifit liken *P. aurulenta* antara lain metanol pa (Merck), asetonitril pro-HPLC (Merck), dan *water for injection* (WFI). Bahan yang digunakan dalam uji aktivitas antibakteri antara lain aquades steril, Mueller Hinton Agar (MHA), Mueller Hinton Broth (MHB), infus NaCl 0,9% , BaCl₂, DMSO, etil asetat, H₂SO₄, gentamisin, alkohol 70%. Bakteri uji yang digunakan adalah bakteri *S. aureus*. Bahan yang digunakan dalam proses karakterisasi senyawa mayor diantaranya, aseton terdeprotonasi ((CD₃)₂CO).

3.4 Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak metanol liken *P. aurulenta* yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri dengan metode mikrodilusi *single concentration*. Uji aktivitas antibakteri ekstrak metanol liken *P. aurulenta* terhadap bakteri *S. aureus* dilakukan dengan konsentrasi 100 µg/mL.

3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada uji aktivitas antibakteri dengan metode mikrodilusi *single concentration* adalah nilai penghambatan dari sampel ekstrak metanol iken *P. aurulenta* terhadap *S. aureus* .

3.4.3 Variabel Terkendali

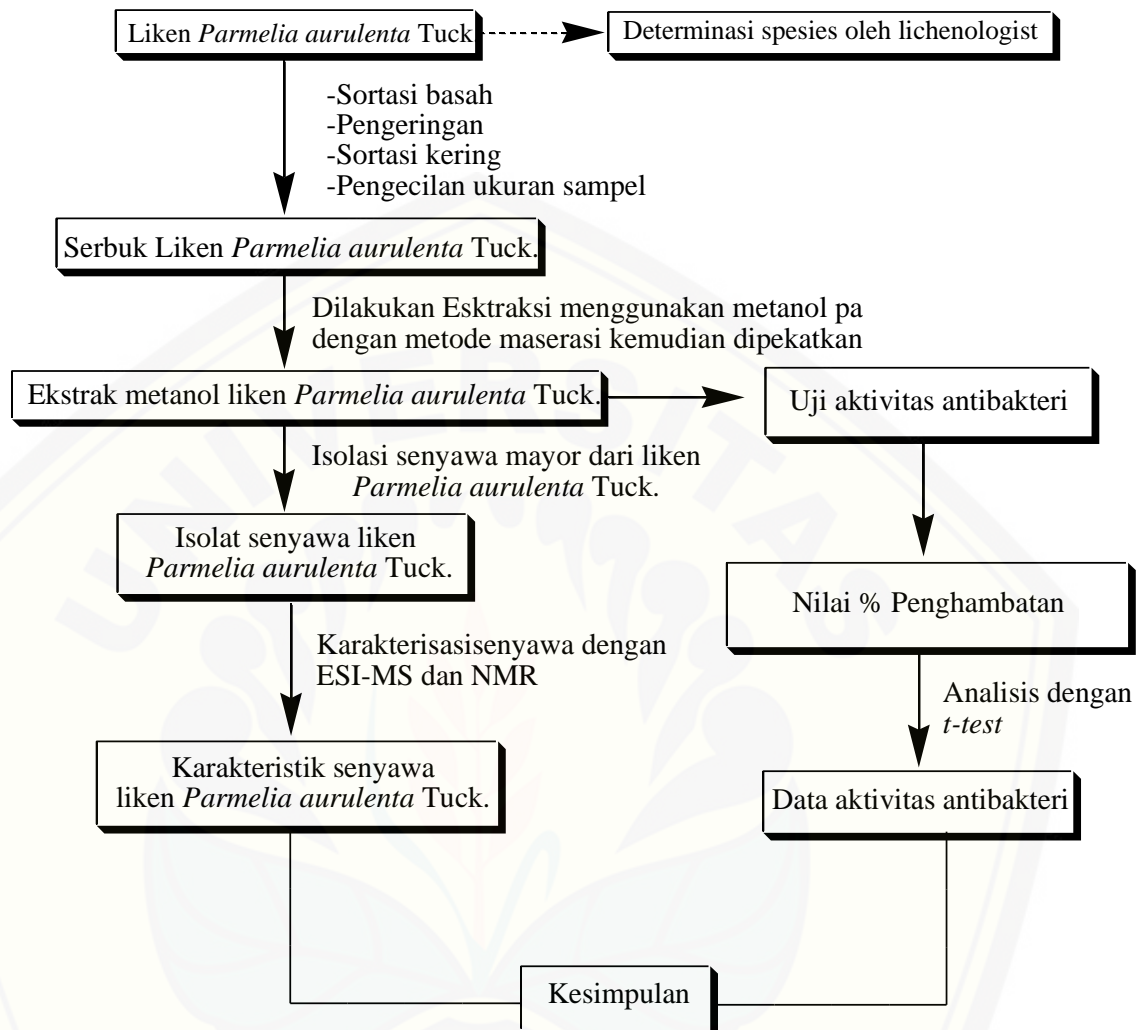
Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah proses pembuatan simplisia liken *P. aurulenta*, metode ekstraksi maserasi dengan bantuan pengadukan menggunakan *magnetic stirrer*, kondisi optimum isolasi, biakan bakteri *S. aureus*, kondisi inkubasi, metode pengujian dan pengamatan tingkat kekeruhan hasil uji antibakteri dan prosedur penelitian.

3.5 Definisi Operasional

Definisi Operasional dalam penelitian ini antara lain sebagai berikut:

- a. Liken yang digunakan dalam penelitian ini adalah *P. aurulenta* yang diperoleh dari Klonding, Bondowoso dan telah dilakukan determinasi di Fakultas Biologi Universitas Gajah Mada. Liken *P. aurulenta* yang digunakan dalam penelitian ini adalah seluruh bagian tumbuhan.
- b. Metode ekstraksi yang digunakan untuk menarik senyawa yang terkandung dalam tumbuhan epifit liken *P. aurulenta* metode ekstraksi maserasi (remaserasi) dengan bantuan pengadukan menggunakan *magnetic stirrer*.
- c. Isolasi merupakan suatu metode untuk memisahkan atau mengambil senyawa bahan alam dari suatu campuran menggunakan pelarut yang sesuai. Pada penelitian ini metode isolasi yang digunakan adalah metode optimum dari hasil pengembangan metode dengan menggunakan HPLC CECIL CE4300 dengan kolom Gemini® 150 x 10 mm.
- d. Pada penelitian ini, metode uji antibakteri yang digunakan adalah metode mikrodilusi *single concentration* dalam media *Cation Adjusted Mueller Hinton Broth* (CAMHB) dengan parameter persen penghambatan.
- e. Dalam karakterisasi senyawa, dilakukan pemeriksaan sampel menggunakan MS, 1D-NMR dan 2D-NMR.

3.6 Rancangan Penelitian



Gambar 3.1 Skema Penelitian

3.7 Prosedur Penelitian

3.6.1 Determinasi Liken

Sampel liken *P. aurulenta* dikumpulkan dari pohon-pohon yang terdapat di wilayah Kloncing, Bondowoso pada bulan Mei 2019. Sampel liken *P. aurulenta* yang memiliki morfologi lengkap dan tidak terkontaminasi oleh spesies liken yang lain dipilih untuk dikirimkan ke Fakultas Biologi Universitas Gajah Mada untuk

selanjutnya dilakukan determinasi spesies oleh likenologis, Ludmilla Fitri Untari, S. Si., M. Si.

3.6.2 Pembuatan Simplisia dan Serbuk Liken *P. aurulenta*

Sampel liken *P. aurulenta* yang telah dikumpulkan selanjutnya dibersihkan dan disortasi untuk memisahkan sampel dari pengotor seperti lumut, kulit batang dari tanaman, dan pengotor lain. Pembuatan Simplisia dilakukan melalui pengeringan sampel liken yang telah disortasi dengan cara diangin-anginkan dalam ruangan sehingga terhindar dari sinar matahari secara langsung. Simplisia liken yang diperoleh sebanyak 35 gram selanjutnya dihaluskan hingga menjadi serbuk menggunakan blender dan diayak untuk menyeragamkan ukuran partikel.

3.6.3 Pembuatan Ekstrak Metanol Liken *P. aurulenta*

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi dengan pengadukan menggunakan *magnetic stirrer*. Sebanyak 35 gram serbuk simplisia liken *P. aurulenta* dimasukkan ke dalam erlenmeyer 500 mL kemudian ditambahkan pelarut metanol *pa* dengan perbandingan awal 1:10. Ekstraksi dilakukan pada suhu ruangan dengan pengadukan menggunakan bantuan *magnetic stirrer* selama 18 jam dengan kecepatan 200 rpm. Hasil ekstraksi dikumpulkan filtratnya dengan menggunakan kertas saring. Residu yang diperoleh dari penyaringan diremaserasi dengan penambahan jumlah pelarut yang sama sebanyak dua kali. Filtrat yang diperoleh kemudian dikumpulkan dalam beaker glass 1000 mL yang selanjutnya dipekatkan dengan menguapkan pelarut ekstraksi dalam lemari asam sehingga didapatkan ekstrak yang kering. Ekstrak yang diperoleh kemudian disimpan dalam vial kaca dan dihitung rendemennya dengan rumus berikut:

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot Ekstrak}}{\text{Bobot Serbuk Simplisia}} \times 100\% \dots\dots(1)$$

3.6.4 Preparasi Sampel Isolasi

Preparasi sampel untuk isolasi dilakukan dengan cara menimbang ekstrak kering *P. aurulenta* sebanyak 500 mg kemudian ditambahkan metanol *pa* sebanyak

10 mL kemudian disonikasi selama 30 menit. Suspensi didiamkan selama satu hari. Endapan berwarna coklat terang yang diperoleh dikumpulkan. Supernatan difilter menggunakan filter berukuran 0,45 μm .

3.6.5 Pengembangan Metode Isolasi Senyawa Mayor Liken *P. aurulenta*

Pengembangan metode dilakukan pada *reversed phase analytical*-HPLC dengan detektor CECIL CE4300, *degasser* CE 4040, pompa CE 4104 yang dikendalikan oleh CE4900. Kolom yang digunakan adalah Gemini[®] 150 x 10 mm. Panjang gelombang yang digunakan ialah 254 nm. Pengembangan metode dilakukan dengan cara mengatur gradien eluen, kecepatan alir, dan waktu pemisahan. Eluen yang digunakan ialah eluen gradien yang terdiri dari air pada pompa A dan asetonitril pro HPLC pada pompa B. Pengembangan metode dimulai dengan menginjeksikan sampel yang telah dipreparasi sebanyak 40 μL dengan perbandingan eluen 0% asetonitril pada menit kedua dan 100% pada menit ke-22 dengan kecepatan alir 1 mL/menit yang dijalankan selama 35 menit. Pengaturan gradient terus dilakukan hingga didapatkan kromatogram yang baik yaitu kromatogram dengan pemisahan paling baik. Metode optimum yang didapatkan lalu dicoba pada kolom preparative HPLC.

3.6.6 Isolasi Senyawa Mayor Liken *P. aurulenta*

Isolasi senyawa dari liken *P. aurulenta* dilakukan dengan HPLC CECIL CE4300 dengan kolom Gemini[®] 150 x 10 mm. Filtrat yang diperoleh kemudian diinjeksikan ke dalam HPLC CECIL CE4300 preparatif dengan kolom Gemini[®] 150 x 10 mm. Metode yang digunakan ialah metode optimum dari pengembangan metode dengan injeksi sampel sebanyak 100 μL dengan konsentrasi 500 mg/ 10 mL. Proses isolasi dilakukan dengan 30 kali injeksi dan menampung isolat pada tabung reaksi. Isolat yang diperoleh kemudian dikeringkan menggunakan *freeze dry*.

3.6.7 Pemeriksaan Kemurnian Senyawa Isolat

Setelah dilakukan proses isolasi senyawa dari Liken *P. aurulenta* selanjutnya dilakukan pemeriksaan kemurnian senyawa isolat sebelum dilanjutkan untuk

tahapan karakterisasi senyawa. Kemurnian isolat diperiksa dengan cara menginjeksikan sebanyak 100 μL sampel dan melihat profil puncak yang dihasilkan.

3.6.8 Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri ekstrak metanol liken *P. aurulenta* Tuck. terhadap bakteri *S. aureus* dilakukan dengan metode mikrodilusi dengan pengujian konsentrasi tunggal. Berikut ini merupakan prosedur uji aktivitas antibakteri yang dilakukan:

3.6.8.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Uji aktivitas antibakteri dilakukan secara aseptis. Semua alat dan bahan yang digunakan dalam proses uji aktivitas antibakteri disterilisasi menggunakan metode panas basah dengan autoklaf. Suhu yang digunakan adalah 121°C dengan tekanan 1 MPa selama 15 menit.

3.6.8.2 Penyiapan Media

a. Pembuatan Media *Cation Adjusted Mueller Hinton Broth* (CAMHB)

Ditimbang Media Mueller Hinton Broth sejumlah 1,05 gram dan dilarutkan dengan 50 mL aqua demineralata dalam erlenmeyer. Media disterilkan dengan metode panas basah menggunakan autoklaf dengan tekanan 1 MPa selama 15 menit pada suhu 121°C . Kemudian media ditambahkan 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. Larutan induk MgCl_2 dibuat dengan menimbang sejumlah 0,3915 gram MgCl_2 dan dilarutkan dalam 10 mL aqua demineralata sehingga diperoleh konsentrasi Mg^{2+} sebesar 10mg/mL. Pembuatan larutan induk CaCl_2 dilakukan dengan menimbang 0,2775 gram CaCl_2 dan dilarutkan dalam 10 mL aqua demineralata sehingga diperoleh konsentrasi Ca^{2+} sebesar 10 mg/mL. Media CAMHB dibuat dengan memipet larutan induk 56,25 μL MgCl_2 dan larutan induk 112,5 μL CaCl_2 kemudian ditambahkan ke dalam media MHB steril sehingga diperoleh konsntrasi Mg^{2+} sebesar 11,25 mg/L dan Ca^{2+} sebesar 22,5 mg/L.

b. Pembuatan Media Mueller Hinton Agar (MHA) untuk Peremajaan Bakteri

Ditimbang Mueller Hilton Agar sebanyak 1,6 gram dan dilarutkan dalam 80 mL aquadest. Campuran tersebut kemudian dipanaskan hingga larutan media menjadi jernih. Media selanjutnya disterilkan dengan metode panas basah menggunakan autoklaf dengan tekanan 1 MPa selama 15 menit pada suhu 121°C. Media yang telah steril dituangkan ke dalam cawan petri steril secara aseptik kemudian didinginkan di dalam LAF hingga media memadat.

3.6.8.3 Pembuatan Standar Mc Farland 0,5

Standar Mc Farland dibuat dengan mencampurkan 9,95 mL H₂SO₄ dengan 0,005 mL BaCl₂ 1% kemudian divortex hingga homogen. Campuran kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 625 nm hingga diperoleh absorbansi campuran dalam rentang 0,08 - 0,13.

3.6.8.4 Peremajaan Biakan Bakteri

Bakteri *S. aureus* diambil menggunakan ose dari stok media MHA, kemudian digoreskan pada media MHA baru dengan cara aseptis. Cawan petri dengan biakan bakteri *S. aureus* direkatkan menggunakan plastik wrap sebanyak 3 lapis kemudian diinkubasi pada suhu 37°C di dalam inkubator selama 24 jam.

3.6.8.5 Pembuatan Biakan Bakteri Aktif

Sebanyak 10 mL media CAMHB disiapkan dalam tube steril, kemudian diambil bakteri *S. aureus* hasil peremajaan sebanyak 1 ose kemudian disuspensikan hingga homogen ke dalam media CAMHB. Absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 625 nm hingga mencapai rentang 0,08- 0,13 sesuai standar Mc Farland 0,5. Kekekutan pada tingkat absorbansi ini menunjukkan bahwa suspensi mengandung 1×10^8 CFU/mL koloni bakteri sebagai biakan aktif.

3.6.8.6 Pembuatan Larutan Kontrol

Kontrol positif yang digunakan dalam ujia aktivitas antibakteri ini adalah gentamisin dengan konsentrasi 1 mg/mL. Kontrol negatif pada pengujian ini adalah DMSO 1% dalam media CAMHB.

3.6.8.7 Pembuatan Larutan Uji

Preparasi larutan uji dilakukan dengan menimbang sejumlah isolat senyawa mayor Liken *P. aurulenta* Tuck. kemudian dilarutkan dengan DMSO 50 μL sehingga diperoleh konsentrasi 100 ppm larutan uji isolat senyawa mayor Liken *P. aurulenta* Tuck. dalam DMSO 1%.

3.6.8.8 Uji Aktivitas Antibakteri dengan Metode Mikrodilusi

Suspensi bakteri dalam CAMHB diencerkan 100 kalinya menggunakan CAMHB hingga diperoleh konsentrasi bakteri dari 1×10^8 CFU/mL menjadi 1×10^6 CFU/mL. Setiap sumuran berisi 50 μL suspensi bakteri dalam CAMHB, lalu 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 $\mu\text{g/mL}$ 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 $\mu\text{g/mL}$ 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 $\mu\text{g/mL}$ dan 50 μL bakteri dalam media CAMHB. Kontrol gentamisin adalah campuran 50 μL gentamisin dengan konsentrasi 1 $\mu\text{g/mL}$ dan 50 μL media CAMHB. Kontrol negatif gentamisin terdiri dari campuran media CAMHB 50 μL dengan bakteri dalam CAMHB 50 μL , sedangkan kontrol media yaitu media CAMHB sebanyak 100 μL . Semua perlakuan dilakukan tiga kali replikasi. Semua prosedur uji antibakteri dilakukan di dalam LAF. Desain *microplate* yang digunakan terdapat pada Gambar 3.1.

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

Gambar 3.2 Desain *microplate*

Keterangan:

- : Ekstrak metanol liken dalam DMSO 1 % 50 μ L + bakteri dalam CAMHB 50 μ L (kelompok perlakuan)
- : DMSO 1% dalam media CAMHB 50 μ L + bakteri dalam CAMHB 50 μ L (kontrol negatif)
- : Gentamisin 50 μ L + bakteri dalam CAMHB 50 μ L (kontrol positif)
- : Media CAMHB 50 μ L + bakteri dalam CAMHB 50 μ L (kontrol negatif gentamisin)
- : Ekstrak metanol liken dalam DMSO 1 % 50 μ L + bakteri dalam CAMHB 50 μ L (kelompok kontrol ekstrak)
- : DMSO 1% dalam media CAMHB 50 μ L + media CAMHB 50 μ L (kontrol DMSO)
- : Gentamisin 50 μ L + media CAMHB (kontrol gentamisin)
- : Media CAMHB 100 μ L (kontrol media)

3.6.8.9 Analisis Data

Hasil percobaan uji aktivitas antibakteri isolat senyawa mayor liken *P. aurulenta* Tuck. terhadap *S. aureus* dengan metode mikrodilusi akan diperoleh data absorbansi. Dari hasil pengukuran absorbansi penghambatan pertumbuhan bakteri dapat dihitung berdasarkan rumus berikut :

$$\% \text{ penghambatan} = \left(1 - \frac{(\text{Abs C} - \text{Abs D})}{(\text{Abs A} - \text{Abs B})}\right) \times 100\% \dots\dots\dots (2)$$

Keterangan :

Abs : absorbansi

A : kontrol negatif (DMSO 1% atau media CAMHB + suspensi bakteri)

B : kontrol media (DMSO 1% atau media CAMHB)

C : larutan uji (ekstrak/gentamisin + suspensi bakteri)

D : kontrol uji (ekstrak/gentamisin + media)

Hasil perhitungan penghambatan yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan metode statistika. Analisis *t-test* dari suatu sampel dilakukan untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan yang bermakna

3.6.9 Karakterisasi Senyawa

3.6.7.1 Pemeriksaan Spektrum Spektrometri Massa

Isolat senyawa liken *P. aurulenta* dikirimkan ke Politeknik Negeri Jember untuk dilakukan pemeriksaan *Electrosopy Ionization Mass Spectrometry* (ESI-MS) Spektra yang diperoleh diinterpretasikan menggunakan bantuan perangkat lunak SeeMS kemudian dianalisis bersama dengan hasil pemeriksaan NMR untuk menentukan struktur senyawa.

3.6.7.2 Pemeriksaan Spektrum 1D-NMR dan 2D-NMR

Sebanyak 10 mg sampel isolat senyawa liken *P. aurulenta* dilarutkan dalam aseton terdeprotonasi ((CD₃)₂CO) kemudian diinjeksikan ke dalam alat NMR. Pengukuran dilakukan pada frekuensi resonansi 400 MHz. Dilakukan perekaman spektra 1D-NMR (¹H dan ¹³C NMR) dan spektra 2D-NMR (gCOSY, gHSQC, gHMBC) masing-masing dengan frekuensi 500 dan 125 MHz pada Bruker Avance 500 MH. Kemudian spektra yang diperoleh akan diinterpretasikan menggunakan aplikasi Mnova versi 14.1 serta dianalisis bersama dengan spektra yang diperoleh dari MS untuk menentukan struktur senyawa.

BAB 5. KESIMPULAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka kesimpulan yang dapat ditarik adalah:

1. Presentase penghambatan ekstrak metanol liken *P. aurulenta* terhadap pertumbuhan bakteri *S. aureus* sebesar $97,2 \pm 0,6\%$ dengan nilai $p \leq 0,05$ yang menunjukkan bahwa ekstrak metanol liken *P. aurulenta* memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus*.
2. Hasil isolasi senyawa mayor liken *P. aurulenta* menunjukkan bahwa senyawa memiliki waktu retensi 19 menit 32,8 detik. Berdasarkan analisis data NMR diketahui bahwa senyawa mayor merupakan struktur *didepside* dari *2'-hydroxy-4'-((2-hydroxy-4-methoxy-6-propylbenzoyl)oxy)-6'-propylbenzoic acid* dengan rumus molekul $C_{21}H_{24}O_7$. Berdasarkan analisis data LRMS, dikonfirmasi bahwa senyawa mayor liken menunjukkan molekul ion $[M+H]^+$ pada puncak 389 m/z dengan massa sebenarnya $[M]$ sebesar 388 amu.

5.2 Saran

Adapun saran untuk penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Perlu dilakukan penelitian mengenai aktivitas antibakteri ekstrak metanol liken *P. aurulenta* terhadap bakteri *S. aureus* dengan pengujian MIC dan perlu dilakukan penelitian aktivitas antibakteri ekstrak metanol liken *P. aurulenta* terhadap bakteri lain.
2. Perlu dilakukan penelitian mengenai uji aktivitas antibakteri isolat dari senyawa mayor liken *P. aurulenta*.
3. Perlu dilakukan uji bioaktivitas lain dari liken *P. aurulenta*, seperti uji aktivitas antikanker dan uji aktivitas antioksidan.

DAFTAR PUSTAKA

- Aminov, R. I., M. Otto, dan A. Sommer. 2010. A brief history of the antibiotic era : lessons learned and challenges for the future. 1(December):1–7.
- Armaleo, D., O. Müller, F. Lutzoni, Ó. S. Andrésón, G. Blanc, H. B. Bode, F. R. Collart, F. D. Grande, F. Dietrich, I. V Grigoriev, S. Joneson, A. Kuo, P. E. Larsen, J. M. L. Jr, D. Lopez, F. Martin, S. P. May, dan T. R. Mcdonald. 2019. The lichen symbiosis re-viewed through the genomes of *Cladonia grayi* and its algal partner *Asterochloris glomerata*. 1–33.
- Asplund, J. dan D. A. Wardle. 2016. How lichens impact on terrestrial community and ecosystem properties
- Azmir, J., I. S. M. Zaidul, M. M. Rahman, K. M. Sharif, A. Mohamed, F. Sahena, M. H. A. Jahurul, K. Ghaffoor, N. A. N. Norulaini, dan A. K. M. Omar. 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials : a review. *Journal of Food Engineering*. 117(4):426–436.
- Balci, M. 2005. *Basic 1H-13C-NMR Spectroscopy*. Ankara: Elsevier.
- Bryon, F., S. Brehm, dan A. Erick. 2003. Sensitization of *Staphylococcus aureus* *Escherichia coli* to antibiotics by the sesquiterpenoids. *Antimicrob Agents Chemother*. 47:3357–3360.
- CLSI. 2015. *M07-A10 Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow*. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute. January.
- CLSI. 2017. *M100 Performance Standards for Antimicrobial*. Edisi 27. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Co-ADD. 2016. Free Compound Screening for Antimicrobial Activity. <https://www.cp-add.org/content/free-screening>
- Col. 2011. Taxonomy Details for *Parmelia aurulenta*.

https://arctos.database.museum/name/Parmelia_aurulenta [Diakses pada November 4, 2019].

Cos, P., A. J. Vlietinck, D. Vanden, dan L. Maes. 2006. Anti-infective potential of natural products : how to develop a stronger in anti-infective potential of natural products : how to develop a stronger in vitro ‘ proof-of-concept ’. (August)

Cowan, M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. 12(4):564–582.

Damayanti, Y. D. 2018. Skrining Fitokimia Dan Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Dan Fraksi Epifit Liken *Parmelia dilatata* Vain. Terhadap *Pseudomonas aeruginosa*. Universitas Jember.

Dayan, G. H., N. Mohamed, I. L. Scully, D. Cooper, E. Begier, J. Eiden, K. U. Jansen, A. Gurtman, A. S. Anderson, G. H. Dayan, N. Mohamed, I. L. Scully, D. Cooper, J. Eiden, K. U. Jansen, A. Gurtman, A. S. Anderson, G. H. Dayan, N. Mohamed, I. L. Scully, D. Cooper, E. Begier, J. Eiden, K. U. Jansen, A. Gurtman, dan A. S. Anderson. 2016. Expert review of vaccines *Staphylococcus aureus* : the current state of disease , pathophysiology and strategies for prevention for prevention. *Expert Review of Vaccines*. 15(11):1373–1392.

Denyer, S. P. 1996. Mechanisms of action of antibacterial biocides. (1995)

Desbenoit, B., E. Galin, S. Akkouche, U. Claude, dan B. Lyon. 2004. Simulating and modeling lichen growth. 23(3)

Dias, D. A. dan S. Urban. 2009. Phytochemical investigation of the australian lichens *Ramalina glaucescens* and *Xanthoria parietina*. (December 2013)

Drexler, M. 2010. *What You Need to Know About Infectious Disease*

Fahselt, D. dan M. Mirando. 1973. Structure of the lichen *Parmelia aurulenta*. (1967)

Foster, T. 1996. *Medical Microbiology*. Galveston: University of Texas Medical

Branch at Galveston.

Foster, T. J. 2017. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* current status and future prospects. (February):430–449.

Gómez-Serranillos, M. P., C. Fernández-Moriano, E. González-Burgos, P. K. Divakar, dan A. Crespo. 2014. Parmeliaceae family: phytochemistry, pharmacological potential and phylogenetic features m. *RSC Advances*. 4(December)

Goldman, E. dan L. H. Green. 2015. *Practical Handbook of Microbiology*. Edisi Third Edit. New York: CRC Press.

Gould, K. 2016. Antibiotics : from prehistory to the present day. 572–575.

Grema, H., Y. Geidam, G. B. Gadzama, dan A. Suleiman. 2015. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a review. (January)

Gross, J. H. 2011. *Mass Spectrometry*. Edisi 2nd Editio. Heidelberg: Springer.

Hassoun, A., P. K. Linden, dan B. Friedman. 2017. Incidence , prevalence , and management of mrsa bacteremia across patient populations — a review of recent developments in mrsa management and treatment. 1–10.

Honegger, R. 2015. *15 The Symbiotic Phenotype of Lichen-Forming Ascomycetes and Their Endo- and Epibionts The Symbiotic Phenotype of Lichen-Forming Ascomycetes and Their Endo- and Epibionts*. September 2012.

Huneck, S. dan Isao Yoshimura. 1996. *Identification of Lichen Substances*. Edisi 1. Verlag Berlin Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Jayalal, U., S. Joshi, S. Oh, Y. J. Koh, dan J. Hur. 2012. A taxonomic study of the genus myelochroa in south korea. 40(4):217–224.

Jha, B. N., M. Shrestha, H. D. Bhattarai, B. Paudel, B. N. Jha, M. Shrestha, T. Bhattarai, dan D. P. Pandey. 2017. Investigation of antioxidant, antimicrobial and toxicity activities of lichens from high altitude regions of nepal. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 17(1):282.

- Kapoor, G., S. Saigal, dan A. Elongavan. 2017. Action and resistance mechanisms of antibiotics : a guide for clinicians basic anatomy of bacterial cell
- Karunakaran, C. 2018. *Spin Resonance Spectroscopy: Principles and Applications*. Edisi 1st Editio. Elsevier.
- Khameneh, B., M. Iranshahy, V. Soheili, B. Sedigheh, dan F. Bazzaz. 2019. Review on plant antimicrobials : a mechanistic viewpoint. 6
- Köck, R., K. Becker, B. Cookson, S. Harbarth, J. Kluytmans, M. Mielke, G. Peters, dan R. L. Skov. 2010. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in europe. *Euro Surveil*. 1–9.
- Kosanić, M. dan B. Ranković. 2015. Lichen secondary metabolites as potential antibiotic agents. (February)
- Kosanić, M., B. Ranković, dan S. Slobodan. 2010. Antimicrobial activity of the lichen *Lecanora frustulosa* and *Parmeliopsis hyperopta* and their divaricatic acid and zeorin constituents. *African Journal of Microbiology Research*. 4(January 2014)
- Latif, Z. dan S. D. Sarker. tanpa tahun. Chapter 10 isolation of natural products by preparative high performance liquid chromatography (prep-hplc). 2012. 864
- Lichenportal.org. 2002. *Myelocrhroa aurulenta*. <https://lichenportal.org/cnalh/taxa/index.php?taxon=54502&clid=1249> [Diakses pada November 5, 2019].
- Macia, M. 2014. Antibacterial activity of lichen secondary metabolite usnic acid is primarily caused by inhibition of rna and dna synthesis
- Madigan, M., J. Martinko, K. Bender, D. Buckley, dan D. Stahl. 2015. *Brock Biology of Microorganisms*. Edisi Fourteenth. England: Pearson.
- Mandal, S. C., V. Mandal, dan A. K. Das. 2015. *Essentials of Botanical Extraction: Principles and Applications*. *Essentials of Botanical Extraction: Principles and Applications*.

- Menichetti, F. 2005. Current and emerging serious gram-positive infections
- Misra, R. dan S. K. Sahoo. 2012. *Antibacterial Activity of Doxycycline-Loaded Nanoparticles*. Edisi 1. Elsevier Inc. *Nanomedicine*.
- Molnar, K. dan E. Farkas. 2010. Current results on biological activities of lichen secondary metabolites : a review current results on biological activities of lichen secondary metabolites : a review. (May 2015)
- Muntu, W. dan M. Nurdin. 2016. Secondary metabolites identification from lichen *Usnea longissima* ach . : bioactivity test of antibacterial. 12(3):347–357.
- Nash, T. H., B. D. Ryan, C. Gries, dan F. Bungartz. 2002. *Lichen Flora of the Greater Sonoran Desert Region Vol I*. Consortium of North American Lichen Herbaria.
- Nayak, B. 2016. Lichen secondary metabolites and its biological activity. (December)
- Nayaka, S. 2014. Studying lichens. (January 2005)
- NNIS. 2000. National nosocomial infections surveillance (nnis) system report , data summary from january 1992-april 2000 , issued june 2000. (June):429–448.
- Nugraha, A. S., D. K. Pratoko, Y. D. Damayanti, N. Dini, 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. 1866
- 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*. 0(0):1–10.
- Oh, J. M., Y. J. Kim, H. S. Gang, J. Han, H. H. Ha, dan H. Kim. 2018. Antimicrobial activity of divaricatic acid isolated from the lichen *Evernia mesomorpha* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Molecules*. 23(3068)

- Otto, M. 2012. Microreview mrsa virulence and spread
- Padhi, S., M. Masi, S. K. Panda, W. Luyten, K. Tayung, dan A. Evidente. 2019. Antimicrobial secondary metabolites of an endolichenic *Aspergillus niger* isolated from lichen thallus of *Parmotrema ravum*. *Natural Product Research*. 0(0):1–8.
- Papazi, A., E. Kastanaki, S. Pirintsos, dan K. Kotzabasis. 2015. Lichen symbiosis : nature's high yielding machines for induced hydrogen production. 1–22.
- Paudel, B., H. Datta, H. Kum, dan H. Oh. 2010. Antibacterial activities of ramalin , usnic acid and its three derivatives isolated from the antarctic lichen *Ramalina terebrata*
- Pavia, D. L. 2009. *Introduction to Spectroscopy*. Edisi 6th Editio. Kanada: Cengage Learning.
- Piovano, M., J. A. Garbarino, dan F. Gianni. 2002. Evaluation of antifungal and antibacterial activities of aromatic metabolites from lichens. 47:235–240.
- Pittayakhajonwut, P., B. V. Sri-indrasutdhi, dan A. A. Dramaee. 2015. Graphisins a and b from the lichen *Graphis tetralocularis*. (June)
- Podterob, A. P. 2008. MEDICINAL plants chemical composition of lichens. 42(10):582–588.
- Pompilio, A., S. Pomponio, V. Di Vincenzo, V. Crocetta, M. Nicoletti, M. Piovano, J. A. Garbarino, dan G. Di Bonaventura. 2013. Research article. 281–292.
- Pratiwi, A. dan T. Ersam. 2013. Uji kemurnian dua senyawa dari ekstrak metanol kayu batang *Garcinia cylindrocarpa*. *Jurnal Sains Dan Seni POMTS*. 2(1):1–4.
- Ranković, B. 2013. *Lichen Secondary Metabolites: Bioactive Properties and Pharmaceutical Potential*. Edisi Second Edi. Kragujevac: Springer.
- Rasul, M. G. 2019. Extraction , isolation and characterization of natural products from medicinal plants. (December 2018)

- Rayner, C. dan W. J. Munckhof. 2005. Antibiotics currently used in the treatment of infections caused by *Staphylococcus aureus*
- Salamah, N., M. Rozak, dan M. Al Abror. 2017. Pengaruh metode penyarian terhadap kadar alkaloid total daun jembirit (*Tabernaemontana sphaerocarpa* . bl) dengan metode spektrofotometri visibel. 7(1):113–122.
- Sarker, S. D., Z. Latif, dan A. I. Gray. 2006. *Natural Products Isolation*. Humana Press Inc.
- Sasidharan, S., Y. Chen, D. Saravanan, K. M. Sundram, dan L. Y. Latha. 2011. Extraction, isolation, and characterization of bioactive compounds from plant's extracts. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines*. 8(1)
- Sesal, C., G. Çobanoğlu, İ. Karaltı, dan B. Açıkgoz. 2016. In vitro antimicrobial potentials of four ramalina lichen species from turkey. (January)
- Silhavy, T. J., D. Kahne, dan S. Walker. 2010. The bacterial cell envelope. 1–16.
- Silverstain, R. M., G. C. Bassler, dan T. C. Morrill. 1986. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. Edisi 4th Editio. Jakarta: Erlangga.
- Sizar, O. dan C. G. Unakal. 2019. *Gram Positive Bacteria*. Treasure Island: StatPearls Publishing.
- Smith, S. L. 1972. Solvent effects and NMR coupling constants. *Nonaqueous Chemistry*. 27/1
- Susanti, M. dan Dachriyanus. 2014. *Kromatografi Cair Kinerja Tinggi*. Edisi 1. Padang: Andalas University Press.
- Tanton, D. A. E. S. dan J. U. A. N. J. A. Rmesto. 2014. Ecosystem properties self-organize in response to a directional fog – vegetation interaction. 95(5):1203–1212.
- Tegos, G. 2012. *Antimicrobial Drug Discovery Emerging Strategies*. Cambridge: CABI Publishing.

- Tessem, M., T. F. Bathen, H. Bertilsson, A. Angelsen, M. Hedenstr, dan T. Andreassen. 2014. Identification of metabolites from 2d ^1H - ^{13}C HSQC NMR using peak correlation plots. 1–8.
- VetBact.org. 2018. *Staphylococcus aureus* Subsp. Aureus
- WHO. 2012. Global Reports for Research of Infectious Diseases of Poverty
- WHO. 2018. The Top 10 Causes of Death
- Wirasuta, I. M. A. G., N. M. W. Astuti, N. N. P. Dharmapradnyawati, N. M. C. A. Wiputri, N. K. Warditiani, N. P. W. Indriani, dan I. N. K. Widjaja. 2016. Uji kemurnian isolat andrografolid dengan HPLC fase terbalik. *Jurnal Farmasi Udayana*. 5(2):24–29.
- Woodford, N. dan D. M. Livermore. 2009. Infections caused by gram-positive bacteria : a review of the global challenge. *Journal of Infection*. 59:S4–S16.
- Yanling, J., L. Xin, dan L. Zhiyuan. tanpa tahun. The antibacterial drug discovery
- Zaman, S. Bin, M. A. Hussain, R. Nye, V. Mehta, dan K. Taib. 2017. A review on antibiotic resistance : alarm bells are ringing origin of antibiotic resistance. 9(6)
- Zambare, V. P., L. P. Christopher, V. P. Zambare, dan L. P. Christopher. 2012. Biopharmaceutical potential of lichens biopharmaceutical potential of lichens. 0209
- Zanger, M. 1972. The determination of aromatic substitution patterns by nuclear magnetic resonance. *Organic Magnetic Resonance*. 4(1)
- Zhang, Q. W., L. G. Lin, dan W. C. Ye. 2018. Techniques for extraction and isolation of natural products : a comprehensive review. *Chinese Medicine*. 1–26.

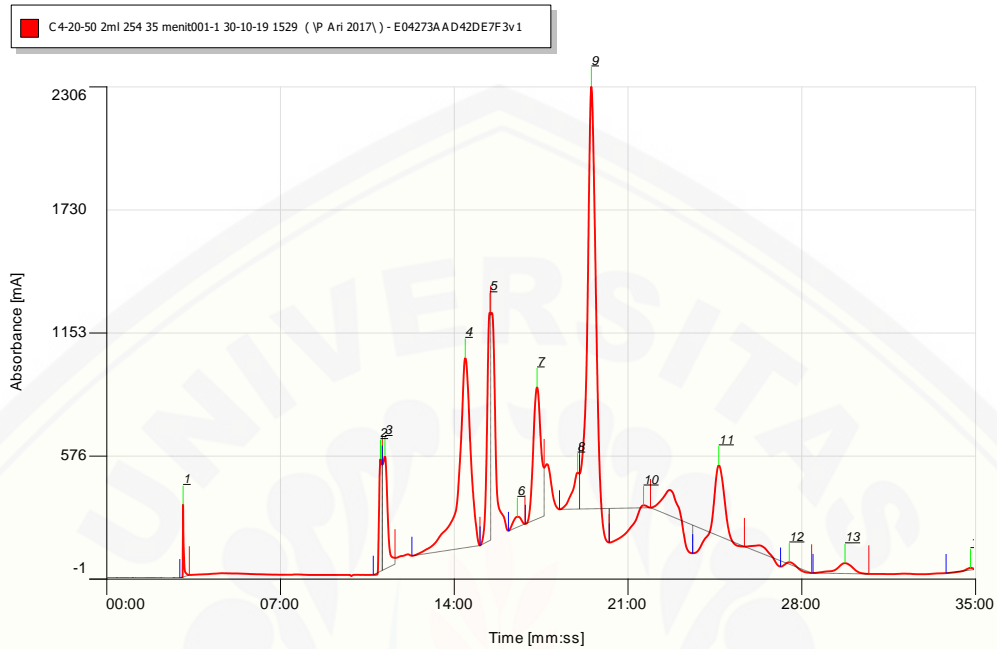
LAMPIRAN**Lampiran 1. Perhitungan Rendemen Ekstrak Metanol Liken *P. aurulenta***

Berat serbuk kering liken	= 35,89 gram
Berat wadah + ekstrak kering	= 16,60 gram
Berat wadah ekstrak kosong	= 13,99 gram
Berat ekstrak kental	= 2,61 gram
Rendemen ekstrak metanol liken	$= \frac{\text{Berat ekstrak kental}}{\text{Berat serbuk awal}} \times 100\%$ $= \frac{2,61 \text{ gram}}{35,89 \text{ gram}} \times 100\%$ $= 7,27\%$

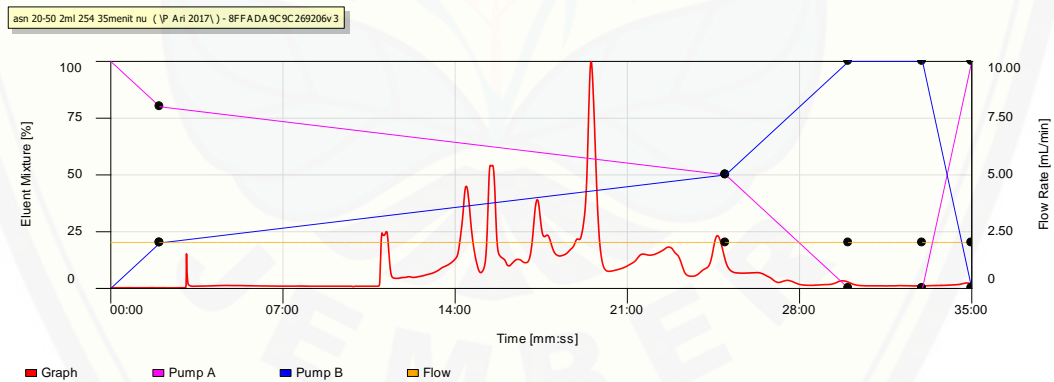


Gambar 1. Ekstrak metanol liken *P. aurulenta*

Lampiran 2. Profil Kromatogram Ekstrak Metanol Liken *P. aurulenta* dengan kolom Semi-Preparatif HPLC



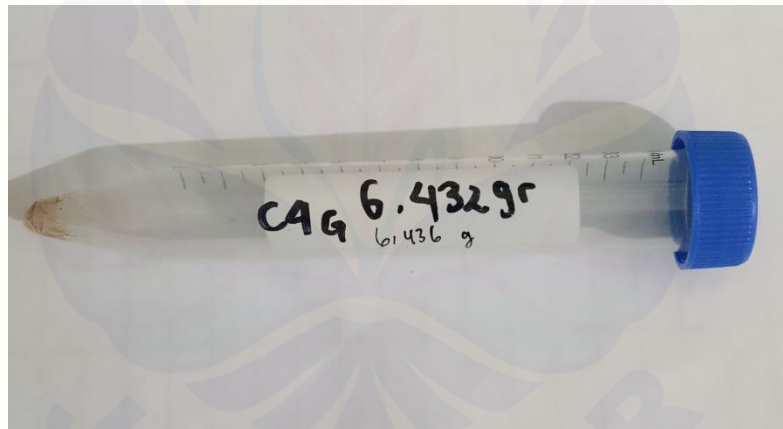
Gambar 1. Kromatogram ekstrak metanol liken *P. aurulenta*



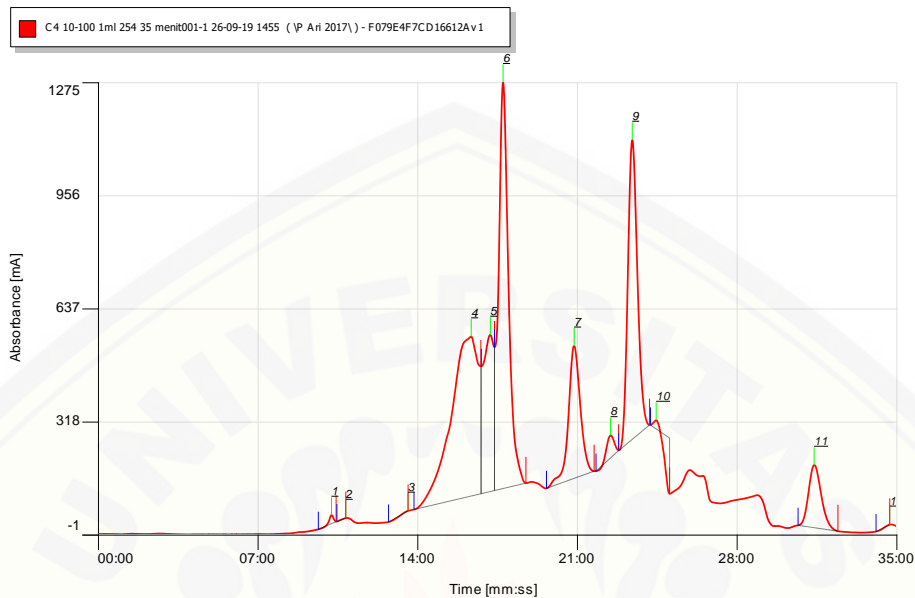
Gambar 2. Kromatogram perbandingan komposisi eluen

Data kromatogram ekstrak metanol liken *P. aurulenta*

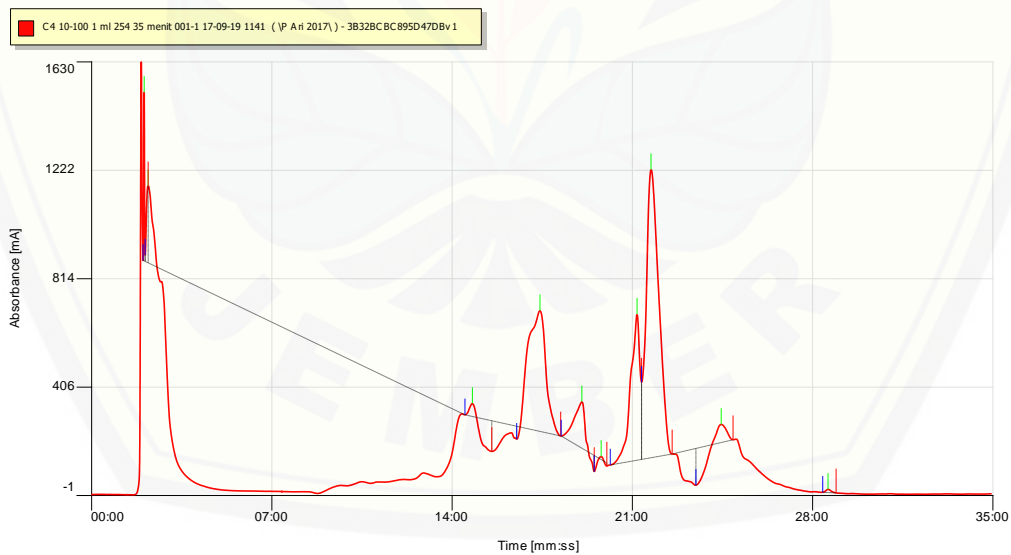
No.	Nama Puncak	Retention time (menit: detik)	Area (mAs)	Height (mA)
001		03:06.0	786.8	339.3
002		11:03.0	4110.7	527.4
003		11:13.9	7389.5	531.2
004		14:28.0	30150.9	891.0
005		15:27.1	10071.6	1071.4
006		16:33.9	1088.0	49.1
007		17:21.6	13245.7	617.7
008		18:59.6	3287.1	172.1
009	Senyawa Mayor Liken <i>P. aurulenta</i>	19:32.8	42453.7	1981.6
010		21:38.9	-8074.5	11.8
011		24:40.9	5518.9	332.1
012		27:31.3	-230.9	9.6
013		29:45.9	2234.0	48.9
014		34:49.3	132.2	10.1



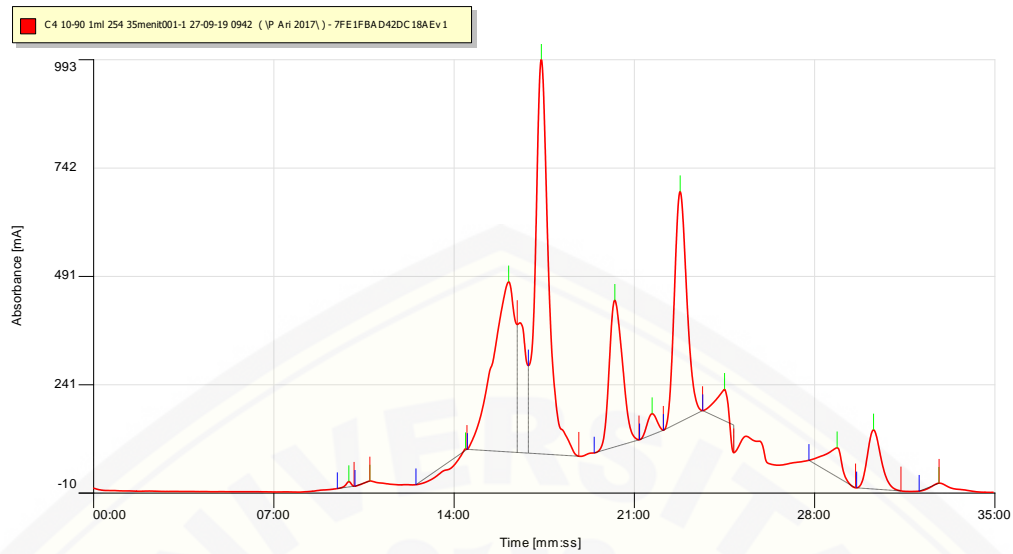
Gambar 3. Isolat kering dari senyawa mayor liken *P. aurulenta*

Lampiran 3. Kromatogram optimasi metode isolasi

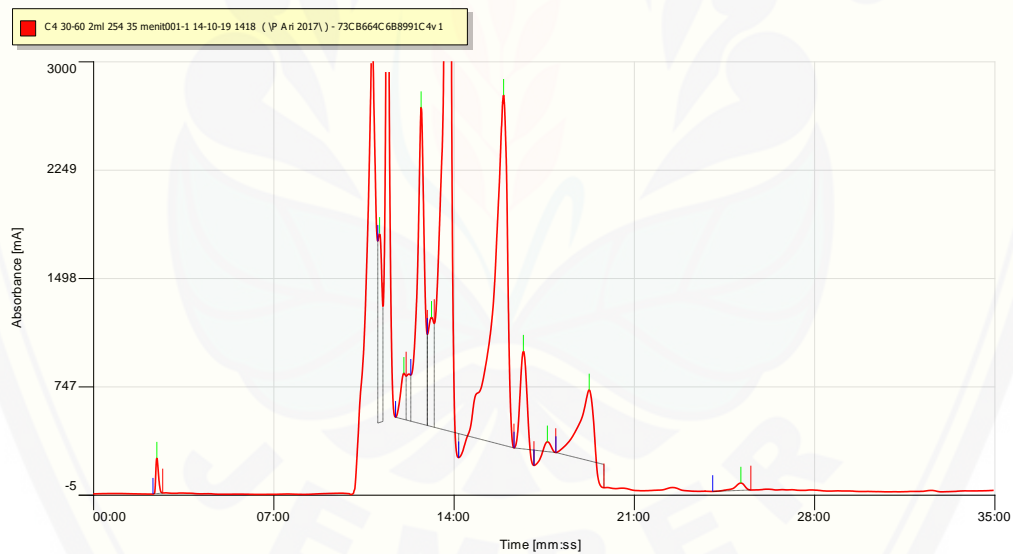
Gambar 1. Profil kromatogram dengan kolom semi-preparatif HPLC dari ekstrak metanol liken *P. aurulenta* dengan kondisi analisis eluen 10%:100% kecepatan alir 2 mL/menit λ 254 nm selama 35 menit.



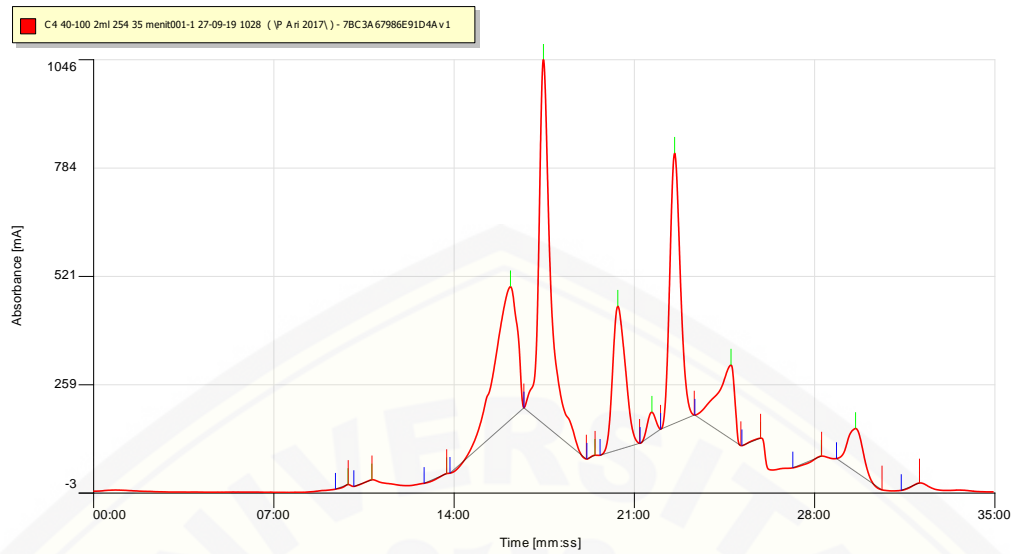
Gambar 2. Profil kromatogram dengan kolom semi-preparatif HPLC dari ekstrak metanol liken *P. aurulenta* dengan kondisi analisis eluen 10%:100% kecepatan alir 2 mL/menit λ 254 nm selama 35 menit.



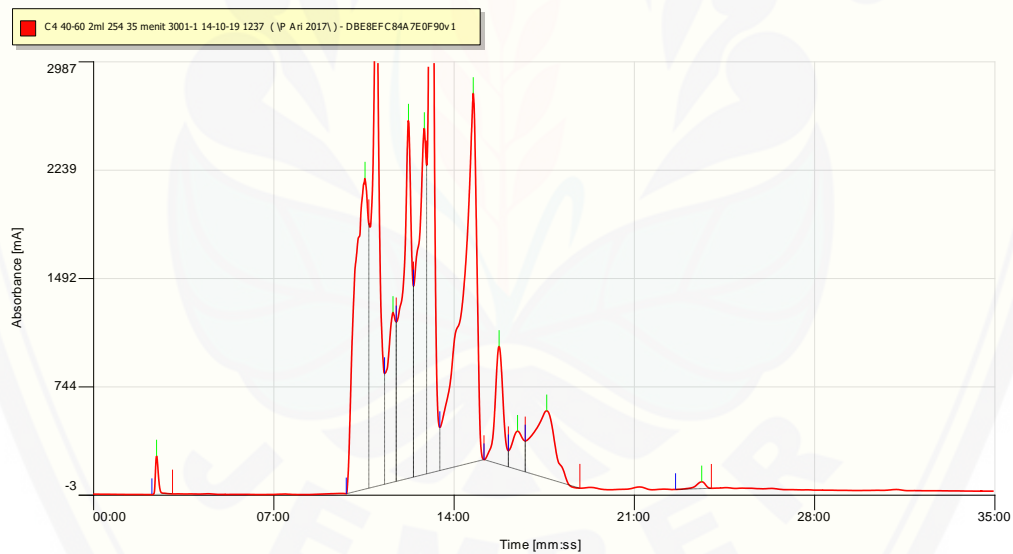
Gambar 3. Profil kromatogram dengan kolom semi-preparatif HPLC dari ekstrak metanol liken *P. aurulenta* dengan kondisi analisis eluen 10%:90% kecepatan alir 2 mL/menit λ 254 nm selama 35 menit.



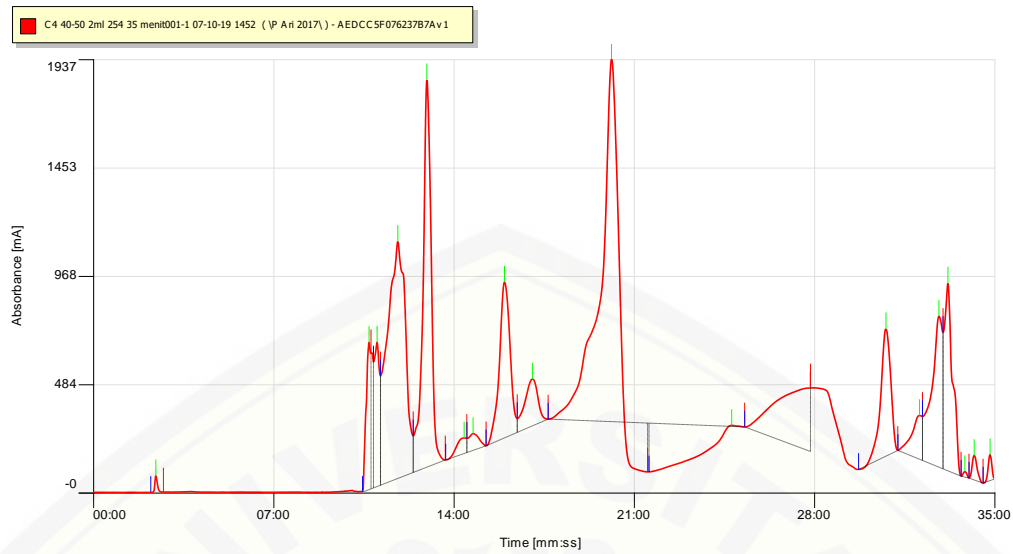
Gambar 4. Profil kromatogram dengan kolom semi-preparatif HPLC dari ekstrak metanol liken *P. aurulenta* dengan kondisi analisis eluen 30%:60% kecepatan alir 2 mL/menit λ 254 nm selama 35 menit.



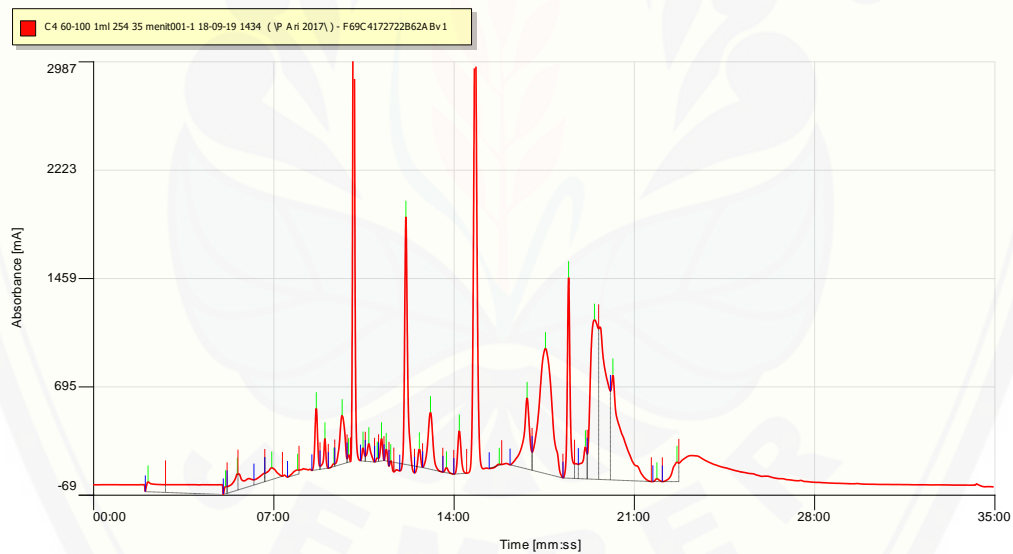
Gambar 5. Profil kromatogram dengan kolom semi-preparatif HPLC dari ekstrak metanol liken *P. aurulenta* dengan kondisi analisis eluen 40%:100% kecepatan alir 2 mL/menit λ 254 nm selama 35 menit.



Gambar 6. Profil kromatogram dengan kolom semi-preparatif HPLC dari ekstrak metanol liken *P. aurulenta* dengan kondisi analisis eluen 40%:60% kecepatan alir 2 mL/menit λ 254 nm selama 35 menit.



Gambar 7. Profil kromatogram dengan kolom semi-preparatif HPLC dari ekstrak metanol liken *P. aurulenta* dengan kondisi analisis eluen 40%:50% kecepatan alir 2 mL/menit λ 254 nm selama 35 menit.



Gambar 8. Profil kromatogram dengan kolom semi-preparatif HPLC dari ekstrak metanol liken *P. aurulenta* dengan kondisi analisis eluen 60%:100% kecepatan alir 1 mL/menit λ 254 nm selama 35 menit.

Lampiran 4. Perhitungan rendemen isolat

Konsentrasi sampel yang disiapkan = 500 mg/10 mL

Volume injeksi sampel = 100 μ L

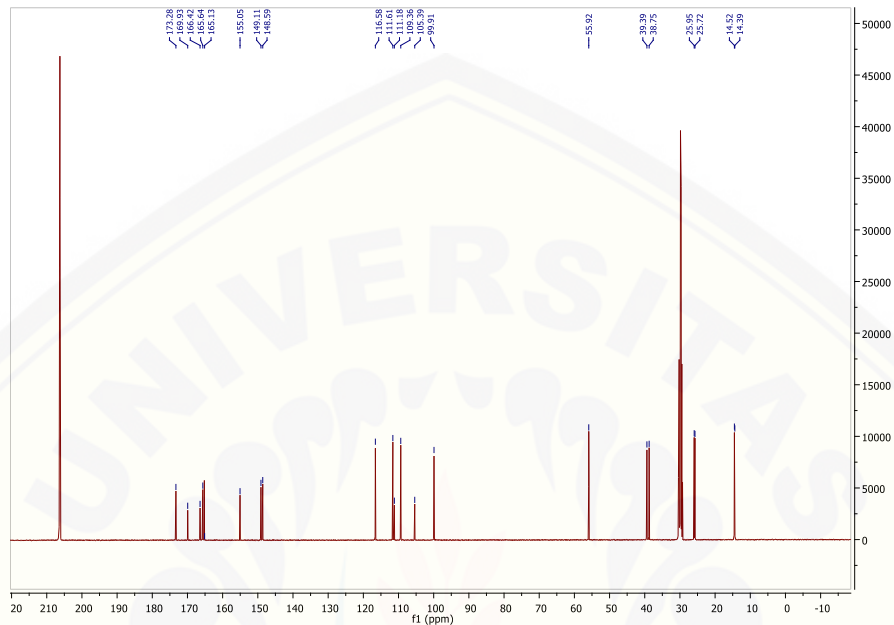
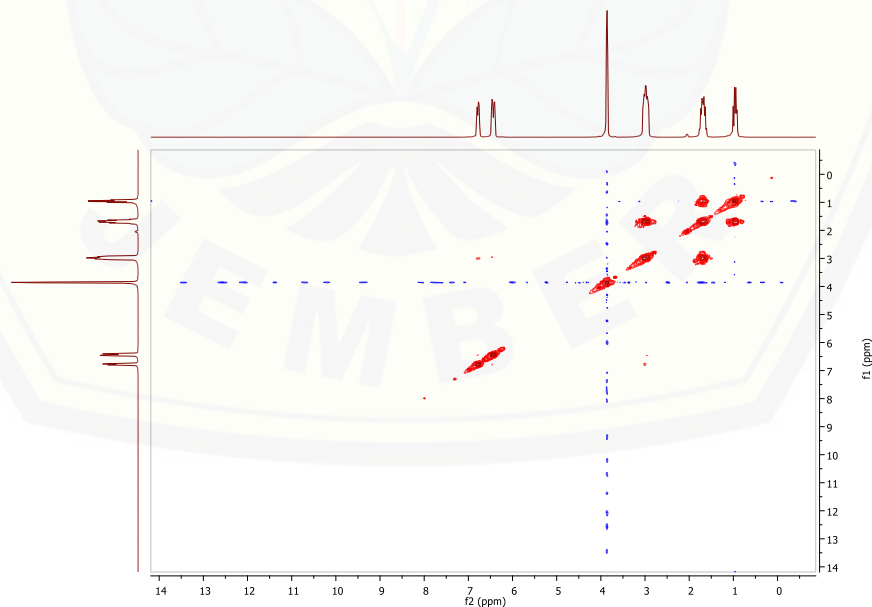
Jumlah injeksi = 32 kali injeksi

Total volume yang diinjeksikan = 3200 μ L \rightarrow 3,2 mL

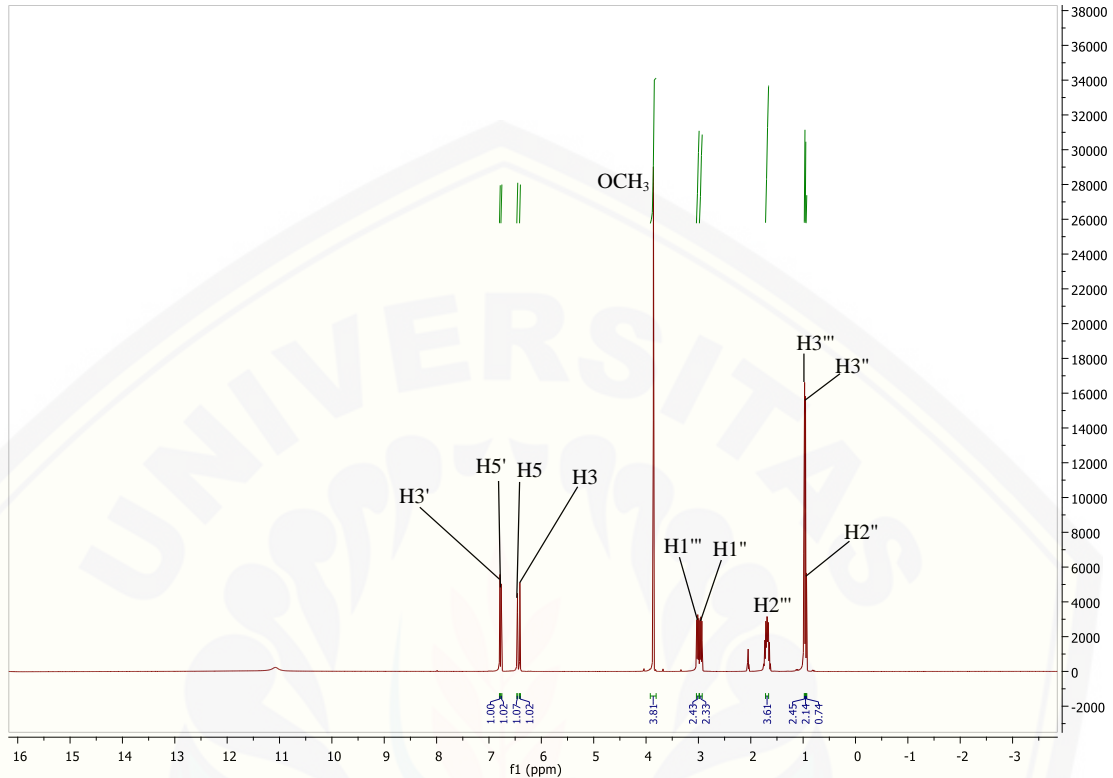
Maka:

$$\frac{500 \text{ mg}}{10 \text{ mL}} = \frac{x \text{ mg}}{3,2 \text{ mL}} \rightarrow 160 \text{ mg ekstrak}$$

$$\begin{aligned} \text{Rendemen isolat} &= \frac{\text{Berat isolat}}{\text{Berat ekstrak}} \times 100\% \\ &= \frac{4 \text{ mg}}{160 \text{ mg}} \times 100\% \\ &= 2,5 \% \end{aligned}$$

Lampiran 5. Data Nuclear Magnetic Resonance (NMR)**1. Spektra ^{13}C -NMR dari Senyawa Mayor Liken *P. aurulenta***Gambar 2. Spektra ^{13}C -NMR senyawa mayor liken *P. aurulenta***2. Spektra COSY dari Senyawa Mayor Liken *P. aurulenta***Gambar 3. Spektra COSY senyawa mayor liken *P. aurulenta*

3. Spektra $^1\text{H-NMR}$ Keseluruhan dari Senyawa Mayor Liken *P. aurulenta*



Gambar 2. Spektra $^1\text{H-NMR}$ senyawa mayor liken *P. aurulenta*

4. Perhitungan konstanta kopling pada $^1\text{H-NMR}$

Coupling constant (J) dalam $^1\text{H-NMR}$ dihitung pada puncak yang ada pada puncak dengan *doublet* dan *triplet multiplicity*.

Proton	Multiplicity	$\Delta\delta$	<i>J</i>
H3	d	0,0060	3
H5	d	0,0060	3
H1''	t	0,0192 ; 0,0194	9,6 ; 9,7
H3'	d	0,0065	3,25
H5'	d	0,0065	3,25
H1'''	t	0,0193 ; 0,0195	9,65 ; 9,75

Contoh perhitungan dilakukan dengan rumus berikut:

$$J = (\Delta\delta) \times 500 \text{ Hz}$$

Keterangan:

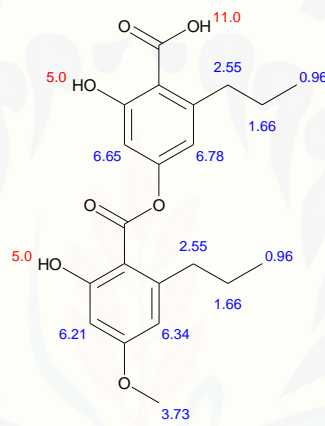
J = coupling constant

$\Delta\delta$ = selisih pergeseran kimia

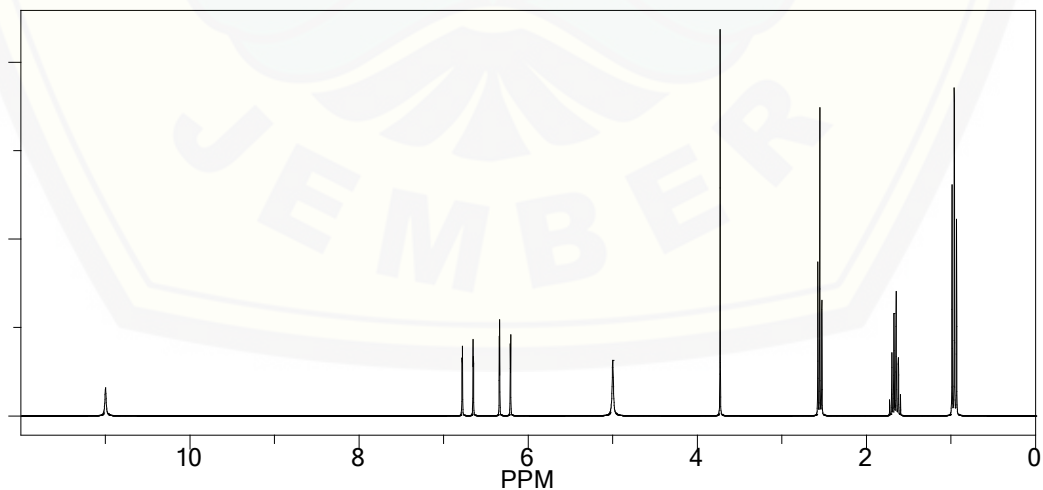
$$J = (0,006) \times 500 \text{ Hz} = 3$$

5. Prediksi spektra $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ dengan perangkat lunak Chemdraw Ultra versi 8.0

ChemNMR H-1 Estimation

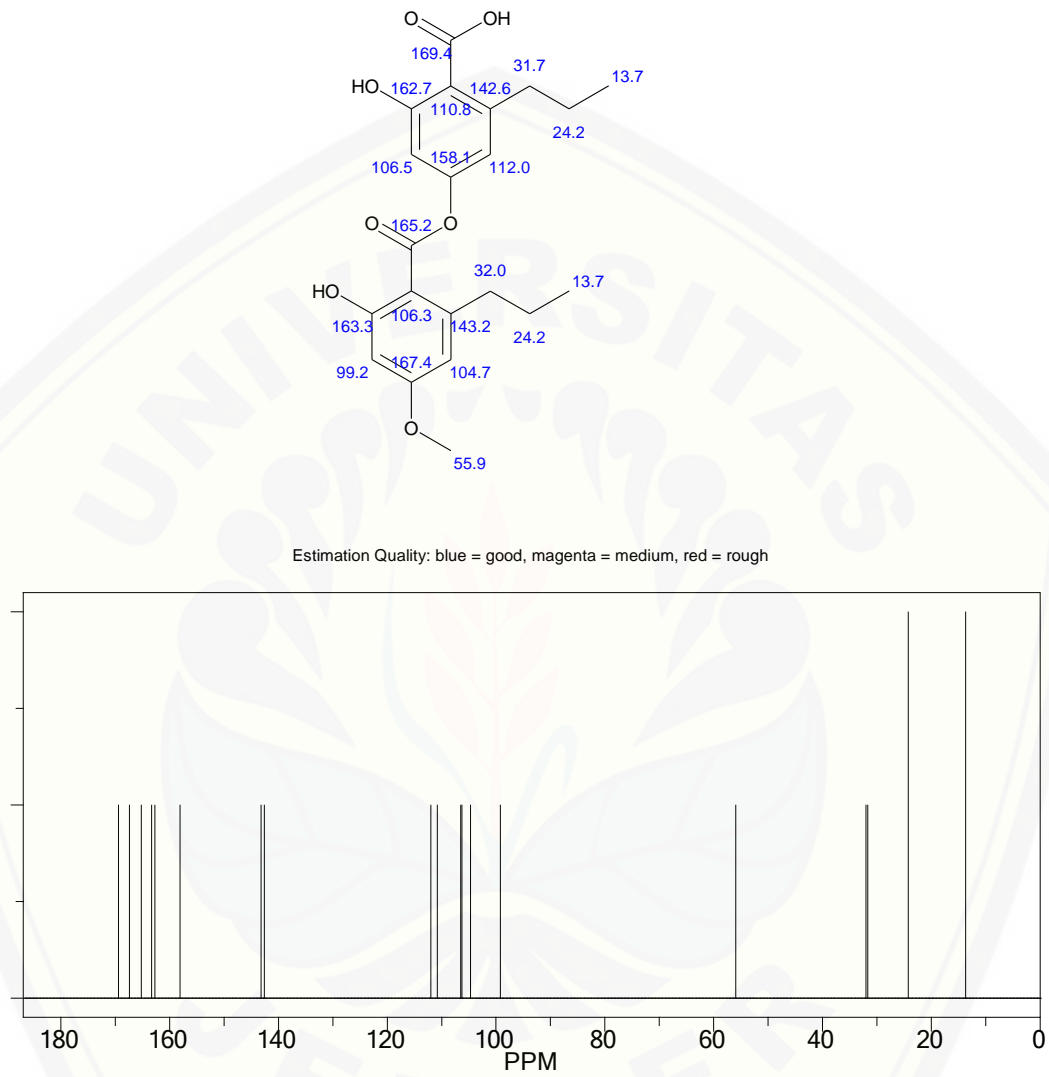


Estimation Quality: blue = good, magenta = medium, red = rough



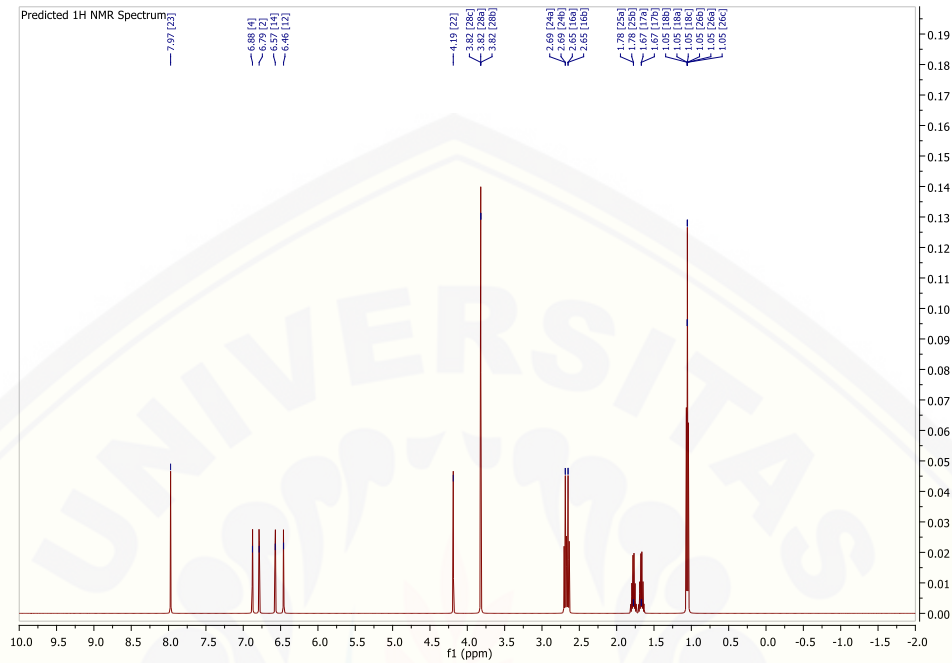
Gambar 1. Prediksi spektra $^1\text{H-NMR}$ senyawa mayor liken *P. aurulenta* dengan perangkat lunak Chemdraw Ultra versi 8.0

ChemNMR C-13 Estimation

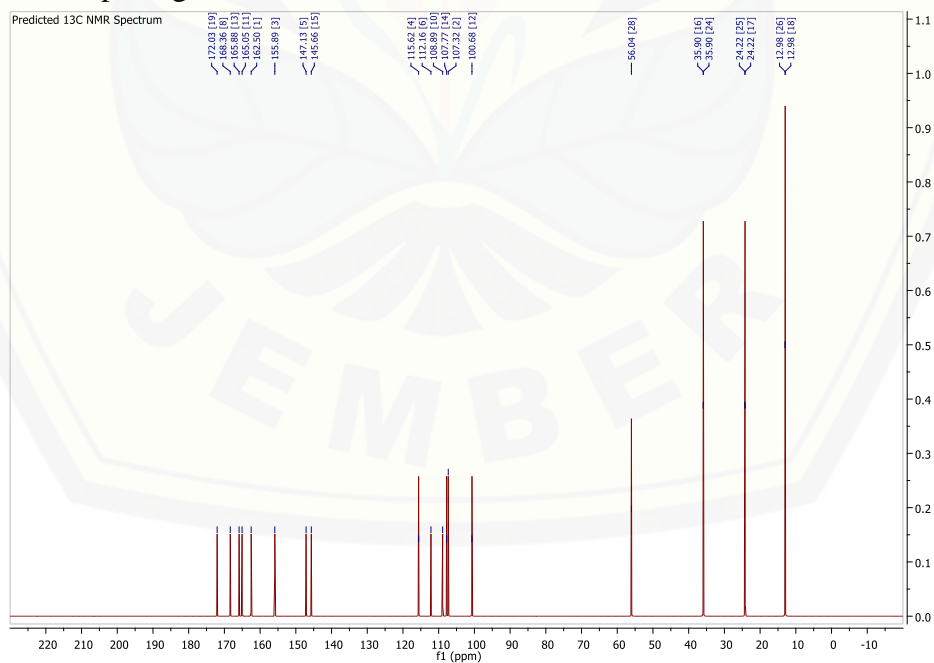


Gambar 2. Prediksi spektra ^{13}C -NMR senyawa mayor liken *P. aurulenta* dengan perangkat lunak Chemdraw Ultra versi 8.0

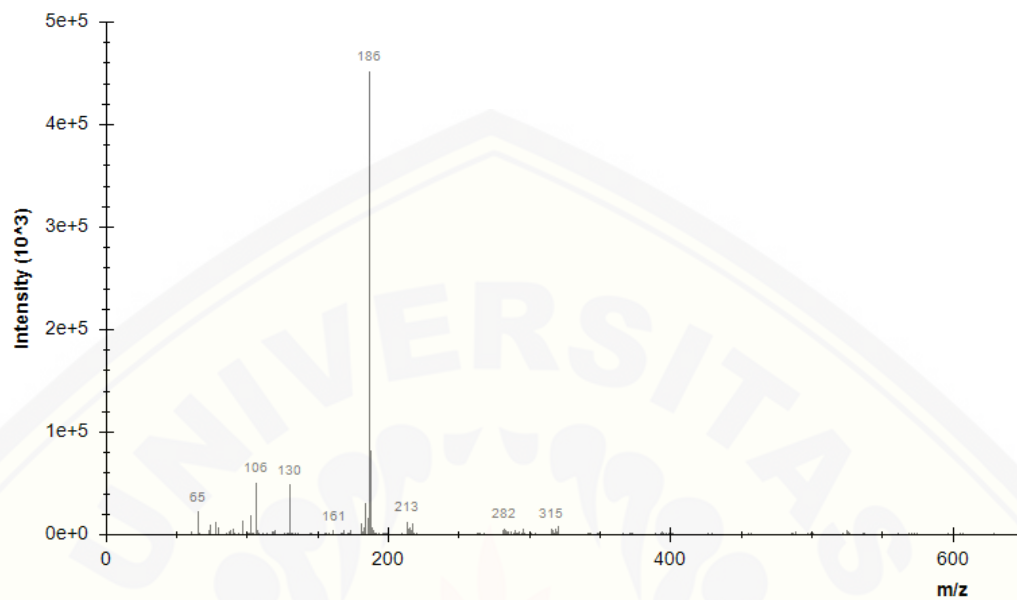
6. Prediksi spektra ^1H -NMR dan ^{13}C -NMR dengan perangkat lunak Mnova versi 14.1



Gambar 1. Prediksi spektra ^1H -NMR senyawa mayor liken *P. aurulenta* dengan perangkat lunak Mnova versi 14.1



Gambar 2. Prediksi spektra ^{13}C -NMR senyawa mayor liken *P. aurulenta* dengan perangkat lunak Mnova versi 14.1

Lampiran 6. Spektra LRMS dari Senyawa Mayor Liken *P. aurulenta***Gambar 1. Spektra LRMS keseluruhan dari Senyawa Mayor Liken *P. aurulenta***

Lampiran 7. Perhitungan Pembuatan Media CAMHB

1. Pembuatan media MHB

Media MHB dibuat dalam 200 mL aquadest. Dalam pembuatan 21 gram media dibutuhkan aquadest sebanyak 1 L.

$$\frac{21 \text{ gram}}{1000 \text{ mL}} = \frac{x}{200 \text{ mL}}$$

$$x = 4,2 \text{ gram}$$

Berat media yang digunakan untuk 200 mL aqua demineralisata adalah 4,2 gram media MHB.

2. Pembuatan larutan induk MgCl₂

Bahan = MgCl₂.6H₂O (Berat molekul= 203,3027 g/mol)

Berat molekul MgCl₂ = 95,211 g/mol

Berat molekul Mg²⁺ = 24,305 g/mol

Dibutuhkan larutan induk MgCl₂ dengan konsentrasi 10 mg Mg²⁺/mL, maka:

$$\begin{aligned} \text{Jumlah MgCl}_2 \text{ dibutuhkan} &= \frac{\text{BM MgCl}_2}{\text{BM Mg}^{2+}} \times 10 \text{ mg/mL} \\ &= \frac{95,211 \text{ g/mol}}{24,305 \text{ g/mol}} \times 10 \text{ mg/mL} \\ &= 39,123 \text{ mg/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Jumlah MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} \text{ dibutuhkan} &= \frac{\text{BM MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}}{\text{BM MgCl}_2} \times 10 \text{ mg/mL} \\ &= \frac{203,3027 \text{ g/mol}}{24,305 \text{ g/mol}} \times 10 \text{ mg/mL} \\ &= 83,539 \text{ mg/mL} \end{aligned}$$

Larutan induk MgCl₂ dibuat dengan menimbang sebanyak 835,39 mg MgCl₂.6H₂O kemudian dilarutkan dalam 10 mL aqua demineralisata.

3. Pembuatan larutan induk CaCl₂

Bahan = CaCl₂.2H₂O (Berat molekul = 147,01 g/mol)

Berat molekul CaCl₂ = 110,98 g/mol

Berat molekul Ca²⁺ = 40,078 g/mol

Dibutuhkan larutan induk CaCl_2 dengan konsentrasi $10 \text{ mg Ca}^{2+}/\text{mL}$, maka:

$$\begin{aligned} \text{Jumlah CaCl}_2 \text{ dibutuhkan} &= \frac{\text{BM CaCl}_2}{\text{BM Ca}^{2+}} \times 10 \text{ mg/mL} \\ &= \frac{110,98 \text{ g/mol}}{40,078 \text{ g/mol}} \times 10 \text{ mg/mL} \\ &= 27,691 \text{ mg/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Jumlah CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} \text{ dibutuhkan} &= \frac{\text{BM CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}}{\text{BM CaCl}_2} \times 27,691 \text{ mg/mL} \\ &= \frac{147,01 \text{ g/mol}}{110,98 \text{ g/mol}} \times 27,691 \text{ mg/mL} \\ &= 36,681 \text{ mg/mL} \end{aligned}$$

Larutan induk CaCl_2 dibuat dengan menimbang sebanyak $366,81 \text{ mg CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ kemudian dilarutkan dalam 10 mL aqua demineralisata.

4. Perhitungan MgCl_2 yang ditambahkan ke dalam media MHB

Konsentrasi kation Mg^{2+} yang dibutuhkan dalam media MHB adalah $11,25 \text{ mg Mg}^{2+}/\text{L}$. Kation Mg^{2+} ditambahkan dari larutan induk MgCl_2 dengan konsentrasi $10 \text{ mg Mg}^{2+}/\text{mL}$. Media MHB yang digunakan sebanyak 200 mL , maka Mg^{2+} yang dibutuhkan sebanyak:

$$\frac{200 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} \times 11,25 \text{ mg Mg}^{2+} = 2,25 \text{ mg Mg}^{2+}$$

Jumlah larutan induk MgCl_2 ditambahkan:

$$\frac{2,25 \text{ mg Mg}^{2+}}{10 \text{ mg Mg}^{2+}} \times 1 \text{ mL} = 0,225 \text{ mL}$$

Larutan induk MgCl_2 dengan konsentrasi $10 \text{ mg Mg}^{2+}/\text{mL}$ ditambahkan sebanyak $0,225 \text{ mL}$ ke dalam media MHB 200 mL .

5. Perhitungan CaCl_2 yang ditambahkan ke dalam media MHB

Konsentrasi kation Ca^{2+} yang dibutuhkan dalam media MHB adalah $22,5 \text{ mg Ca}^{2+}/\text{L}$. Kation Ca^{2+} ditambahkan dari larutan induk CaCl_2 dengan konsentrasi $10 \text{ mg Ca}^{2+}/\text{mL}$. Media MHB yang digunakan sebanyak 200 mL , maka Ca^{2+} yang dibutuhkan sebanyak:

$$\frac{200 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} \times 22,5 \text{ mg Ca}^{2+} = 4,5 \text{ mg Ca}^{2+}$$

Jumlah larutan induk CaCl_2 ditambahkan:

$$\frac{4,5 \text{ mg Ca}^{2+}}{10 \text{ mg Ca}^{2+}} \times 1 \text{ mL} = 0,450 \text{ mL}$$

Larutan induk CaCl_2 dengan konsentrasi $10 \text{ mg Ca}^{2+}/\text{mL}$ ditambahkan sebanyak $0,450 \text{ mL}$ ke dalam media MHB 200 mL .



Lampiran 8. Perhitungan Konsentrasi Gentamisin sebagai Kontrol Positif dalam Uji Aktivitas Antibakteri

1. Pembuatan larutan induk gentamisin

Bahan	= larutan injeksi gentamisin sulfat 40 mg/mL
Berat molekul gentamisin sulfat	= 575,675 g/mol
Berat molekul gentamisin	= 477,596 g/mol
Konsentrasi gentamisin	$= \frac{\text{BM gentamisin}}{\text{BM gentamisin sulfat}} \times 40 \text{ mg/mL}$ $= \frac{477,596 \text{ g/mol}}{575,675 \text{ g/mol}} \times 40 \text{ mg/mL}$ $= 33,185 \text{ mg/mL}$ $= 33185 \text{ } \mu\text{g/mL}$

Konsentrasi larutan induk gentamisin yang diperlukan adalah 100 $\mu\text{g/mL}$

$$\frac{\text{Volume gentamisin yang dibutuhkan}}{10000 \text{ } \mu\text{L media CAMHB}} \times 33185 \text{ } \mu\text{g/mL} = 100 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

Volume gentamisin yang dibutuhkan = 30,1 μL ad media CAMHB sebanyak 10000 μL sehingga diperoleh konsentrasi larutan induk gentamisin sebesar 100 $\mu\text{g/mL}$.

2. Pengenceran larutan induk gentamisin

Konsentrasi gentamisin yang dibutuhkan dalam uji aktivitas antibakteri adalah 1 $\mu\text{g/mL}$. Perhitungan konsentrasi sebagai berikut:

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

Volume larutan induk yang dibutuhkan = 100 μL ad media CAMHB sebanyak 10000 μL sehingga diperoleh konsentrasi gentamisin sebagai kontrol positif sebesar 1 $\mu\text{g/mL}$.

Lampiran 9. Perhitungan Konsentrasi Ekstrak Metanol Liken *P. aurulenta* dalam Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri ekstrak metanol liken *P. aurulenta* dilakukan dengan konsentrasi tunggal yaitu sebesar 100 µg/mL. Berikut perhitungan konsentrasi larutan uji:

$$\text{Konsentrasi larutan uji} = \frac{\text{Bobot ekstrak (mg)}}{\text{Jumlah DMSO yang ditambahkan (}\mu\text{L)}}$$

$$\text{Konsentrasi larutan uji} = \frac{1,045 \text{ mg}}{104,5 \mu\text{L}}$$

$$\text{Konsentrasi larutan uji} = 10000 \mu\text{g/mL}$$

Ekstrak kemudian diencerkan 100x menggunakan media CAMHB sehingga konsentrasi DMSO dalam larutan ekstrak menjadi 1% dan konsentrasi ekstrak menjadi 100 µg/mL. Berikut perhitungan untuk memperoleh konsentrasi akhir setelah pengenceran:

$$\text{Konsentrasi larutan uji akhir} = \frac{\text{Volume larutan uji awal yang diambil (}\mu\text{L)}}{\text{Jumlah larutan (}\mu\text{L)}} \times 10000 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{Konsentrasi larutan uji akhir} = \frac{50 \mu\text{L}}{5000 \mu\text{L}} \times 10000 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{Konsentrasi larutan uji akhir} = 100 \mu\text{g/mL}$$

Lampiran 10. Data Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Liken *P. aurulenta*

1. Data hasil absorbansi dan presentase penghambatan pertumbuhan bakteri untuk gentamisin.

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi			Penghambatan (%)
	Uji	Kontrol uji	Kontrol negatif	
1	0,118	0,114		99,5
	0,118	0,115	0,934	99,6
	0,122	0,116		99,3

Contoh perhitungan presentase penghambatan pertumbuhan bakteri dalam uji aktivitas antibakteri ekstrak metanol liken:

$$\% \text{ penghambatan} = \left(1 - \frac{(\text{Abs C} - \text{Abs D})}{(\text{Abs A} - \text{Abs B})}\right) \times 100\%$$

Keterangan:

Abs = absorbansi

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

B = kontrol media (DMSO 1% atau media)

C = uji (ekstrak atau gentamisin + suspensi bakteri)

D = kontrol uji (ekstrak atau gentamisin + media)

$$\% \text{ penghambatan} = \left(1 - \frac{(\text{Abs C} - \text{Abs D})}{(\text{Abs A} - \text{Abs B})}\right) \times 100\%$$

$$\% \text{ penghambatan} = \left(1 - \frac{(0,118 - 0,114)}{(0,934 - 0,125)}\right) \times 100\%$$

$$\% \text{ penghambatan} = 99,5 \%$$

2. Data hasil absorbansi dan presentase penghambatan pertumbuhan bakteri untuk DMSO 1%.

Konsentrasi	Absorbansi			Penghambatan (%)	
	Uji	Kontrol uji	Kontrol negatif		Kontrol media
1 %	0,964	0,121	0,934	0,125	-4,3
	0,969	0,122			-4,8
	0,992	0,123			-7,5

Contoh perhitungan:

$$\% \text{ penghambatan} = \left(1 - \frac{(\text{Abs C} - \text{Abs D})}{(\text{Abs A} - \text{Abs B})}\right) \times 100\%$$

$$\% \text{ penghambatan} = \left(1 - \frac{(0,964 - 0,121)}{(0,934 - 0,125)}\right) \times 100\%$$

$$\% \text{ penghambatan} = -4,3 \%$$

3. Data hasil absorbansi dan presentase penghambatan pertumbuhan bakteri untuk ekstrak metanol liken *P. aurulenta* dengan konsentrasi 100 µg/mL

Konsentrasi (µg/mL)	Absorbansi			Penghambatan (%)	
	Uji	Kontrol uji	Kontrol negatif		Kontrol media
100	0,131	0,11	0,975	0,122	97,5
	0,131	0,111			97,7
	0,141	0,111			96,5

Contoh perhitungan:

$$\% \text{ penghambatan} = \left(1 - \frac{(\text{Abs C} - \text{Abs D})}{(\text{Abs A} - \text{Abs B})}\right) \times 100\%$$

$$\% \text{ penghambatan} = \left(1 - \frac{(0,131 - 0,110)}{(0,975 - 0,122)}\right) \times 100\%$$

$$\% \text{ penghambatan} = 97,5 \%$$

Lampiran 11. Analisis Data Hasil Uji Aktivitas Antibakteri**Tests of Normality**

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk	
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df
persenPenghambatan	.328	3	.	.871	3

One-Sample Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
persenPenghambatan	3	97.2333	.64291	.37118

One-Sample Test

	Test Value = 0			
	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference
persenPenghambatan	261.954	2	.000	97.23333

One-Sample Test

	Test Value = 0	
	95% Confidence Interval of the Difference	
	Lower	Upper
persenPenghambatan	95.6363	98.8304