



**SKRIPSI – TK 141581**

**UJI ANTIMIKROBA KURKUMINOID TERLARUT  
DALAM *NATURAL DEEP EUTECTIC SOLVENTS* (NADES)**

**Oleh:**

**Galang Ramdhani Fitra Gama  
NRP. 0221164500006**

**Zandhika Alfi Pratama  
NRP. 0221164500018**

**Dosen Pembimbing  
Orchidea Rachmaniah, S.T., M.T.  
NIP. 19780214 200312 2 001  
Prof. Dr. Ir. H. M. Rachimoellah, Dipl.Est.  
NIP. 19491117 197612 1 001**

**DEPARTEMEN TEKNIK KIMIA  
FAKULTAS TEKNOLOGI INDUSTRI  
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER  
SURABAYA 2018**



**FINAL PROJECT – TK 141581**

**ANTIMICROBIAL TESTING OF DISSOLVED  
CURCUMINOIDS IN NATURAL DEEP EUTECTIC  
SOLVENTS (NADES)**

**By:**

**Galang Ramdhani Fitra Gama**

**NRP. 0221164500006**

**Zandhika Alfi Pratama**

**NRP. 0221164500018**

**Advisors:**

**Orchidea Rachmaniah, S.T., M.T.**

**NIP. 19780214 200312 2 001**

**Prof. Dr. Ir. H. M. Rachimoellah, Dipl.Est.**

**NIP. 19491117 197612 1 001**

**DEPARTMENT OF CHEMICAL ENGINEERING  
FACULTY OF TECHNOLOGY INDUSTRY  
SEPULUH NOPEMBER INSTITUTE OF TECHNOLOGY  
SURABAYA 2018**

## LEMBAR PENGESAHAN

### Uji Antimikroba Kurkuminoid Terlarut dalam *Natural Deep Eutectic Solvents (NADES)*"

Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat memperoleh gelar  
Sarjana Teknik Kimia pada Program Studi S-1  
Departemen Teknik Kimia Fakultas Teknologi Industri  
Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya

Oleh:

**Galang Ramdhani F.G.**

02211645000006

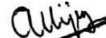
**Zandhika Alfi P.**

02211645000018

Disetujui Oleh Tim Penguji Tugas Akhir :

1. Orchidea Rachmaniah, S.T., M.T  
(Pembimbing I)
2. Prof. Dr. Ir. M. Rachimoellah, Dipl. EST  
(Pembimbing II)
3. Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M.Eng.  
(Penguji I)
4. Dr. Ir. Sumarno, M.Eng.  
(Penguji II)
5. Siti Zullaikah, S.T., M.T., Ph.D.  
(Penguji III)

  
.....  
  
.....

  
.....

  
.....  
  
.....



## UJI ANTIMIKROBA KURKUMINOID TERLARUT DALAM NATURAL DEEP EUTECTIC SOLVENTS (NADES)

Nama/NRP : 1. Galang Ramdhani F. G. (02211645000006)  
2. Zandhika Alfi P. (02211645000018)

Departemen : Teknik Kimia FTI – ITS

Pembimbing : 1. Orchidea Rachmaniah, S.T., M.T.  
2. Prof. Dr. Ir. H. M. Rachimoellah, Dipl.Est.

### ABSTRAK

Kurkuminoid yang terkandung di dalam kunyit (*Curcuma domestica valetton*) merupakan bahan aktif yang dapat berperan sebagai antibakteri. Kurkuminoid mempunyai aktivitas menghambat proses proliferasi sel bakteri dan diduga sebagai target penting dari antibiotik. Kurkuminoid yang merupakan senyawa *polyphenolic* ini mampu mempengaruhi fungsi membran sel bakteri yang berperan sebagai barier terhadap enzim otolitik, dengan memodifikasi lipid bilayer membran sel bakteri. Kurkuminoid dan *protocatechuic acid* yang merupakan senyawa *polyphenolic* berkerjasama dengan mekanisme kerja antimikroba, yaitu melalui penghambatan fungsi membran sel bakteri dan penghambatan sintesis protein pada sel bakteri. Senyawa *polyphenolic* ini memiliki aktivitas antibakteri dan memiliki daya hambat yang baik dalam konsentrasi yang kecil. Tahap uji antimikroba diuji menggunakan kurkuminoid yang dilarutkan dalam tiga jenis NADES yang berbeda yaitu: MAS-H<sub>2</sub>O (1:1:18); FG-H<sub>2</sub>O (1:1:7); dan FS-H<sub>2</sub>O (2:1:15) pada dua jenis mikroba: *E. coli* (gram negatif) dan *S. aureus* (gram positif). Uji *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dan *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC) dilakukan dengan konsentrasi kurkuminoid bervariasi ( 0 mM; 2 mM; 2,25 mM; 2,5 mM; 2,75 mM; 3 mM; 3,25 mM; 3,5 mM; 3,75 mM; dan 4 mM) dan konsentrasi suspensi bakteri uji dengan kepadatan 10<sup>8</sup> sel/ml sebanyak 1 mL dengan waktu inkubasi 1x24 jam dan suhu inkubasi 37 °C. Uji antimikroba juga dilakukan terhadap masing-masing komponen murni

penyusun NADES: sukrosa, *malic acid*, fruktosa, dan glukosa. NADES MAS-H<sub>2</sub>O memiliki aktivitas anti-mikroba paling efektif dibandingkan dengan tipe netral (FG-H<sub>2</sub>O dan FS-H<sub>2</sub>O). Toksisitas NADES MAS-H<sub>2</sub>O terhadap *E. coli* dan *S. aureus* dipengaruhi oleh pH larutan NADES, dalam hal ini adalah *malic acid*. Asam malat adalah asam kuat (pH < 3), sementara NADES mengandung gula memiliki pH lebih tinggi (pH > 5) dan tidak memberikan aktivitas baik MIC maupun MBC.

***Kata kunci:*** Antibakteri, Kurkuminoid, NADES

## ANTIMICROBIAL TESTING OF DISSOLVED CURCUMINOIDS IN NATURAL DEEP EUTECTIC SOLVENTS (NADES)

Name/NRP : 1. Galang Ramdhani F. G. (02211645000006)

2. Zandhika Alfi P. (02211645000018)

Departemen : Teknik Kimia FTI – ITS

Pembimbing : 1. Orchidea Rachmaniah, S.T., M.T.

2. Prof. Dr. Ir. H. M. Rachimoellah, Dipl.Est.

### ABSTRACT

*Curcuminoids, a bioactive compound from turmeric (Curcuma domestica valetton) has antibacterial effect. It is also indicated has an inhibitory effect to the bacterial cell proliferation; hence potentially use as an important target of antibiotics. Curcuminoids, a polyphenolic compound able to affect the function of bacterial cell membranes that act as a barrier to the autolithic enzymes, by modifying the lipid bilayer of bacterial cell membranes. Curcuminoids and protocatechuic acid which is also a polyphenolic compound in cooperation with antimicrobial action mechanisms, namely through inhibition of bacterial cell membrane function and inhibition of protein synthesis in bacterial cells. These polyphenolic compounds have antibacterial activity and have good drag in small concentrations. The antimicrobial test stage was conducted using curcuminoids dissolved in three different types of NADES: MAS-H<sub>2</sub>O (1:1:18); FG-H<sub>2</sub>O (1:1:1); and FS-H<sub>2</sub>O (2:1:15) in two types of microbes: Escherichia coli (gram-negative) and Staphylococcus aureus (gram-positive). Minimum Inhibitory Concentration and Minimum Bactericidal Concentration were tested with concentrations of curcuminoids (0 mM; 2 mM; 2.25 mM; 2.5 mM; 2.75 mM; 3 mM; 3.25 mM; 3,5 mM; 3.75 mM; and 4 mM), concentration of bacterial suspension about 10<sup>8</sup> cells/ml of 1 mL with incubation time of 1x24 hours and incubation temperature 37°C. Antimicrobial tests were also conducted on each of the pure composite components of NADES,*

*such as: sucrose; malic acid; fructose; and glucose. NADES (MAS-H<sub>2</sub>O) was the most effective anti-microbial activity compared to pure types (FG-H<sub>2</sub>O and FS-H<sub>2</sub>O). The toxicity of NADES to a microorganism might be affected by the pH of NADES itself. NADES contained malic acid was a strong acid (pH <3), while NADES contained sugar was weak acid (pH >5). The active compound of curcuminoids had broad spectrum of antibacterial activity was active antibacterial against various types of gram positive and gram negative bacteria.*

**Keywords:** *Antibacterial, Curcuminoids, NADES*

## KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Allah SWT, Tuhan bagi seluruh alam, karena hanya dengan Rahmat dan Hidayah-Nya kami dapat mengerjakan dan menyelesaikan Laporan Skripsi dengan judul "*Uji Antimikroba Kurkuminoid Terlarut dalam Natural Deep Eutectic Solvent (NADES)*". Skripsi merupakan salah satu syarat mata kuliah yang harus ditempuh untuk memperoleh gelar Sarjana dari Departemen Teknik Kimia, Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya.

Penulis menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada semua pihak yang telah membantu dan memberikan dukungan selama penyusunan laporan ini, terutama kepada :

1. Allah SWT yang telah memberikan kami Rahmat dan Hidayah-Nya.
2. Bapak-Ibu, orang tua kami tercinta, yang telah memberikan dukungan dan motivasi baik secara moril maupun materil, serta doa.
3. Ibu Orchidea Rachmaniah, S.T., M.T selaku Dosen Pembimbing 1 dan Bapak Prof. Dr. Ir. M. Rachimoellah, Dipl, EST selaku Dosen Pembimbing 2 yang telah membimbing dan mendukung kami sepeunya.
4. Bapak Juwari, ST., M.Eng., Ph.D selaku Kepala Departemen Teknik Kimia FTI – ITS
5. Teman-teman *Biomassa Crew*, teman-teman S-1 Teknik Kimia, serta semua pihak yang telah membantu selama proses pengerjaan laporan ini.

Kami menyadari bahwa Laporan Skripsi ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu kami mohon masukan dan saran agar dapat memperbaiki skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi kita semua. Amin.

Surabaya, Juli 2018

Penyusun



# DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN.....	i
ABSTRAK .....	ii
<i>ABSTRACT</i> .....	iv
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR GAMBAR .....	ix
DAFTAR TABEL .....	xi
<b>I PENDAHULUAN</b> .....	1
I.1 Latar Belakang .....	1
I.2 Rumusan Masalah .....	2
I.3 Tujuan Penelitian .....	4
I.4 Manfaat Penelitian .....	4
<b>II TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	5
II.1 Kurkuminoid .....	5
II.2 <i>Natural Deep Eutectic Solvents</i> (NADES).....	9
II.3 Struktur Natural Deep Eutectic Solvent (NADES).....	13
II.4 Senyawa Antimikroba.....	15
II.4.1 Bakteri <i>Escherichia coli</i> .....	21
II.4.2 Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> .....	22
II.5 Studi Hasil Penelitian Sebelumnya .....	23
<b>III METODE PENELITIAN</b> .....	27
III.1 Alat dan Bahan.....	27
III.1.1 Alat.....	27
III.1.2 Bahan.....	27
III.2 Variabel Penelitian .....	27
III.2.1 Variabel Tetap.....	27
III.2.2 Variabel Bebas .....	27
III.2.3 Variabel Respon .....	28
III.3 Metode Penelitian.....	28
III.3.1 Pembuatan Kurkumin Terlarut dalam <i>Natural Deep Eutectic Solvents</i> (NADES) .....	29

III.3.1.1	Pembuatan Natural Deep Eutectic Solvents (NADES) .....	29
III.3.1.	Pencampuran Kurkuminoid pada Natural Deep Eutectic Solvents .....	30
III.3.2	Uji <i>Minimum Inhibitory Concentration</i> .....	30
III.3.3	Uji <i>Minimum Bactericidal Concentration</i> .....	31
III.4	Diagram Alir Metode Penelitian .....	33
III.4.1	Diagram Alir Penelitian Secara Keseluruhan .....	33
III.4.2	Diagram Alir Pembuatan Kurkumin Terlarut dalam <i>Natural Deep Eutectic Solvents</i> (NADES).....	34
III.4.2.1	Diagram Alir Pembuatan Natural Deep Eutectic Solvents (NADES) .....	34
III.4.2.2	Diagram Alir Pencampuran Kurkuminoid pada Natural Deep Eutectic Solvents .....	35
III.4.3	Diagram Alir Uji <i>Minimum Inhibitory Concentration</i> .....	36
III.4.4	Diagram Alir Uji <i>Minimum Bactericidal Concentration</i> .....	38
<b>IV</b>	<b>HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	41
IV.1	<i>Minimum Inhibitory Concentration (MIC)</i> .....	41
IV.2	<i>Minimum Bactericidal Concentration (MBC)</i> .....	48
IV.3	Analisis Efek Anti-Mikroba pada NADES.....	56
IV.4	Analisis Efek Anti-Mikroba pada Kurkuminoid Terlarut .....	65
<b>V</b>	<b>KESIMPULAN DAN SARAN</b> .....	69
V.1	Kesimpulan .....	69
V.2	Saran .....	69
<b>DAFTAR PUSTAKA</b>	.....	xii

## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar 1</b> Struktur Kimia dari (A) Curcumin, (B) Demethoxycurcumin, (C) Bis-demethoxycurcumin (Lestari & Indrayanto, 2014).....	6
<b>Gambar 2</b> Bentuk Tautomer Kurkumin; bentuk Keto (a) dan bentuk Enol (b) (Kumavat, et al., 2013).....	7
<b>Gambar 3</b> Diagram fase sistem eutektik (Hakeem & Otito, 2008).....	12
<b>Gambar 4</b> Penomoran pada sukrosa (kiri) dan malic acid (kanan) pada $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ NOESY) (Choi, et al., 2011)...	13
<b>Gambar 5</b> Penomoran pada 1-2-propanediol (kiri) dan choline chloride (kanan) pada HOESY dan $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ NOESY (Dai, et al., 2013).....	14
<b>Gambar 6</b> Struktur Dinding Sel Bakteri (a) Gram-positif dan (b) Gram-negatif (Prescott, 2002).....	16
<b>Gambar 7</b> Mekanisme Lisis pada Bakteri.....	18
<b>Gambar 8</b> Efek Tekanan Osmotik pada Sel Bakteri.....	21
<b>Gambar 9</b> Bakteri E. Coli (Kusuma, 2010).....	22
<b>Gambar 10</b> Bakteri mikroskopis <i>S. Aureus</i> (Kusuma, 2010).....	23
<b>Gambar 11</b> Perancangan Penelitian.....	29
<b>Gambar 12</b> Skema pembuatan NADES.....	30
<b>Gambar 13</b> Uji MIC pada kurkumin terlarut NADES jenis <i>malic acid</i> -sukrosa-air (MAS-H <sub>2</sub> O = 1:1:18) pada berbagai konsentrasi dengan <i>S.Aureus</i> .....	41
<b>Gambar 14</b> Uji MIC pada kurkumin terlarut NADES jenis <i>malic acid</i> -sukrosa-air (MAS-H <sub>2</sub> O = 1:1:18) pada berbagai konsentrasi dengan <i>E.Coli</i> .....	42

<b>Gambar 15</b>	<i>Optical Density</i> pada kurkumin dengan berbagai konsentrasi terlarut dalam NADES jenis Fruktosa-Glukosa-air (FG-H <sub>2</sub> O = 1:1:7) pada <i>E.Coli</i> .....	45
<b>Gambar 16</b>	<i>Optical Density</i> pada kurkumin dengan berbagai konsentrasi terlarut dalam NADES jenis Fruktosa-Glukosa-air (FG-H <sub>2</sub> O = 1:1:7) pada <i>S.Aureus</i> .....	46
<b>Gambar 17</b>	<i>Optical Density</i> pada kurkumin dengan berbagai konsentrasi terlarut dalam NADES jenis Fruktosa-Sukrosa-air (FS-H <sub>2</sub> O = 2:1:15) pada <i>E.Coli</i> .....	47
<b>Gambar 18</b>	<i>Optical Density</i> pada kurkumin dengan berbagai konsentrasi terlarut dalam NADES jenis Fruktosa-Sukrosa-air (FS-H <sub>2</sub> O = 2:1:15) pada <i>S.Aureus</i> .....	47
<b>Gambar 19</b>	Metode Uji MBC (Yilmaz, 2012).....	49

## DAFTAR TABEL

<b>Tabel 1</b> Nama Kimia dan Berat Molekul dari <i>Curcuminoid</i> (Pushpakumari, et al., 2014).....	6
<b>Tabel 2</b> Daftar ILs dan DES Alami (Choi, et al., 2011) .....	10
<b>Tabel 3</b> Penelitian-Penelitian Sebelumnya .....	24
<b>Tabel 4</b> <i>Minimum Bactericidal Concentration</i> pada MAS-H <sub>2</sub> O (1:1:18).....	50
<b>Tabel 5</b> <i>Minimum Bactericidal Concentration</i> pada FG-H <sub>2</sub> O (1:1:7).....	51
<b>Tabel 6</b> <i>Minimum Bactericidal Concentration</i> pada FS-H <sub>2</sub> O (2:1:15).....	53
<b>Tabel 7</b> <i>Hydrogen Bond Donor (HBD)</i> dan <i>Hydrogen Bond Acceptor (HBA)</i> pada NADES .....	57
<b>Tabel 8</b> Perbandingan Hasil Penelitian-Penelitian Sebelumnya.	60



# I PENDAHULUAN

## I.1 Latar Belakang

Penyakit infeksi seperti saluran pernafasan dan diare atau gangguan saluran pencernaan merupakan salah satu penyebab kematian terbesar di dunia disebabkan oleh mikroorganismenya patogen. Penyakit infeksi sampai saat ini masih diatasi dengan menggunakan antibiotik. Penggunaan antibiotik yang tidak rasional bisa membuat mikroba patogen menjadi resisten dan munculnya mikroba resisten ini penyebab utama kegagalan pengobatan penyakit infeksi. Oleh sebab itu, diperlukan alternatif dalam mengatasi masalah ini dengan memanfaatkan bahan-bahan aktif antimikroba dari tanaman obat (Eva, 2015).

Indonesia merupakan negara yang terkenal dengan hasil pertanian dan tanaman herbal. Sumber daya alam yang dimiliki telah memberikan manfaat dalam kehidupan sehari-hari disamping sebagai bahan makanan juga dimanfaatkan sebagai obat tradisional. Penelitian mengenai tanaman – tanaman herbal yang memiliki aktivitas antibakteri telah dilakukan untuk mengurangi efek samping penggunaan bahan kimia dalam produk hasil pertanian dan peternakan. Tanaman herbal tersebut diantaranya kunyit, kunyit putih, temulawak dan temuireng. Kunyit putih merupakan tanaman herbal yang potensial dan banyak diteliti untuk pengobatan kanker. Temulawak juga memiliki khasiat sebagai anti inflamasi, antioksidan dan antitumor (Nurina Rahmawati, 2014).

Kurkumin yang terkandung di dalam kunyit (*Curcuma domestica valetan*) merupakan bahan aktif yang dapat berperan sebagai antibakteri. Kurkumin mempunyai aktivitas menghambat proses proliferasi sel bakteri dan diduga sebagai target penting dari antibiotik. Kurkumin yang merupakan senyawa *polyphenolic* ini mampu mempengaruhi fungsi membran sel bakteri yang berperan sebagai barrier terhadap enzim otolitik, dengan memodifikasi lipid bilayer membran sel bakteri. *Curcumin* dan *protocatechuic acid* yang merupakan senyawa *polyphenolic* berkerjasama dengan

mekanisme kerja antimikroba, yaitu melalui penghambatan fungsi membran sel bakteri dan penghambatan sintesis protein pada sel bakteri. Senyawa *polyphenolic* ini memiliki aktivitas antibakteri dan memiliki daya hambat yang baik dalam konsentrasi yang kecil (Prima & Handajani, 2013).

Akhir-akhir ini cukup banyak penelitian yang dilakukan mengenai ekstraksi senyawa aktif menggunakan *green solvent*, salah satunya yaitu DES (*Deep Eutetic Solvent*). *Deep Eutetic Solvent* atau DES adalah campuran dari dua komponen dengan mol ratio tertentu yang memiliki *melting point* campuran lebih rendah (<100 °C) dibandingkan dengan *melting point* individu (Dai, et al., 2013). *Deep Eutetic Solvent* (DES) selanjutnya disebut sebagai *Natural Deep Eutectic Solvent* (NADES) mengingat dapat dibuat dari campuran komponen yang terdapat di alam, misalnya komponen yang terdapat pada tumbuhan, hewan, maupun tubuh manusia. NADES tersusun dari kombinasi campuran metabolit primer seperti gula, gula alkohol, poli-alkohol, basa organik, asam organik dan asam amino. Beberapa keuntungan NADES sebagai pelarut adalah meliputi biaya pembuatannya rendah, memiliki tekanan uap rendah, tidak mudah terbakar, *biodegradable*, dan berpotensi sebagai pelarut untuk berbagai zat terlarut.

Dai, Spronsen, Witkamp, Verpoorte & Choi (2013) menunjukkan bahwa berbagai makromolekul dan mikromolekul dapat terlarut dengan baik dalam NADES. Makromolekul seperti gluten, DNA, dan pati serta mikromolekul seperti rutin, quercetin, asam sinamat, taxol, carthamin, ginkgolide B memberikan kelarutan yang baik pada beberapa jenis NADES yang diujikan. Kelarutan senyawa-senyawa tersebut dalam NADES secara substansial lebih tinggi dibandingkan kelarutan mereka di air dan metanol.

## **I.2 Rumusan Masalah**

*Curcuma* banyak dimanfaatkan sebagai antimikroba karena kandungan senyawa aktifnya mampu mencegah pertumbuhan mikroba. Tanaman ini terdiri dari beberapa spesies diantaranya



*Curcuma xanthorrhiza* (temulawak), *C. domestica* (kunyit), *C. mangga* (temu mangga), *C. zedoaria* (temu putih), *C. heyneana* (temu giring) dan *C. aeruginosa* (temu hitam). Rimpang *Curcuma* ini sering digunakan dalam pengobatan tradisional diantaranya mengobati keputihan, diare, obat jerawat dan gatal-gatal.<sup>3</sup> *Curcuma* juga berpeluang sebagai obat infeksi yang disebabkan oleh mikroba patogen seperti *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* (Eva, 2015).

Senyawa antimikroba adalah suatu komponen yang mampu menghambat pertumbuhan dan aktivitas mikroba. Senyawa ini dapat bersifat bakterisidal (membunuh bakteri), bakteristatik (menghambat pertumbuhan bakteri), fungisidal (membunuh kapang), fungistatik (menghambat pertumbuhan kapang), ataupun germisidal (menghambat germinasi spora bakteri). Senyawa tersebut dapat dikelompokkan menjadi senyawa antibakteri dan antikapang. Beberapa senyawa kimia utama yang bersifat antimikroba, yaitu senyawa fenolik, halogen, minyak atsiri, zat warna, asam dan basa. Senyawa antimikroba alami yang berasal dari tanaman antara lain: fitoaleksin, asam organik, minyak atsiri, senyawa fenolik, pigmen dan senyawa kerabatnya (Pandiangan, 2008).

NADES adalah kelompok baru eksipien dengan potensi diperumusan obat yang tidak larut dengan baik. NADES tampaknya sangat berguna dalam persiapan yang ditujukan untuk terapi fotodinamik antimikroba (aPDT) karena kemampuannya sebagai Photosensitizer (PS) fototoksitas. Kemampuan NADES untuk mengunci kurkumin dalam satu konformasi molekul tertentu dan juga untuk memberikan potensi sebagai efek fototoksik dari fotosensitizer ini menekankan sifat unik NADES sebagai pelarut (Opsvik, et al., 2015).

Berdasarkan uraian di atas dilakukan penelitian untuk mengetahui uji antimikroba ekstrak kurkumin dalam terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus*, dikarenakan bahwa senyawa aktif dalam rimpang kunyit mampu menghambat pertumbuhan jamur, virus, dan bakteri, baik Gram positif maupun Gram negatif, seperti

*E. coli* dan *S. aureus*, karena kunyit mengandung berbagai senyawa diantaranya adalah kurkumin dan minyak atsiri (Yuliati, 2016) sehingga nantinya diharapkan dapat mengetahui pemanfaatan NADES sebagai pelarut kurkumin untuk proses penghambatan pertumbuhan bakteri.

### **I.3 Tujuan Penelitian**

Tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Melakukan uji antimikroba terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* menggunakan kurkumin (terlarut dalam NADES).
2. Mengetahui jenis NADES yang memiliki daya antimikroba yang paling efektif (diantara jeni-jenis NADES yang diujikan).

### **I.4 Manfaat Penelitian**

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat mengetahui senyawa kurkumin dalam pelarut *Natural Deep Eutectic Solvents* (NADES) untuk penghambatan pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

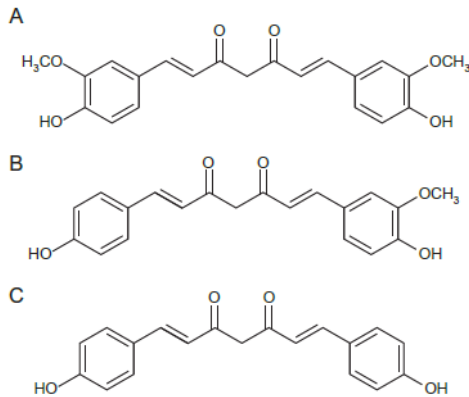
## II TINJAUAN PUSTAKA

### II.1 Kurkuminoid

Kurkuminoid merupakan golongan senyawa yang terdapat pada tanaman marga *Curcuma* yang memberikan warna kuning. Kurkuminoid terdiri atas komponen senyawa kurkumin ( $C_{21}H_{20}O_6$ ), desmetoksikurkumin ( $C_{20}H_{18}O_5$ ), dan bisdesmetoksikurkumin ( $C_{19}H_{16}O_4$ ) yang memiliki bobot molekul berturut-turut sebesar. 368, 308, dan 338 g/mol (Setiawan, 2010).

Kurkumin dan oleoresin adalah dua komponen utama yang merupakan faktor paling penting untuk signifikansi kunyit (Jayandran, et al., 2015). Kunyit mengandung sekitar 4-6% berat kurkuminoid, 2-4% berat minyak esensial dan 2-3% berat karotenoid termasuk *turmerone*, *atlantone*, dan *zingiberone*. Konstituante lain termasuk gula-gula, protein dan resin juga terkandung di dalam kunyit.

Kurkumin merupakan salah satu zat utama yang ditemukan dalam rimpang *Curcuma mangga* dan *curcuma* lainnya. Kurkumin umumnya digunakan sebagai zat pewarna serta *additive*. WHO makanan menyatakan asupan harian diterima dari kurkumin sebagai aditif makanan di kisaran 0-3 mg/kg. Penggunaan terapeutik kurkumin juga telah diteliti dan dikenal memiliki potensi penggunaan sebagai anti-kanker (Lestari & Indrayanto, 2014).



**Gambar 1** Struktur Kimia dari (A) Curcumin, (B) Demethoxycurcumin, (C) Bis-demethoxycurcumin (Lestari & Indrayanto, 2014)

**Tabel 1** Nama Kimia dan Berat Molekul dari *Curcuminoid* (Pushpakumari, et al., 2014)

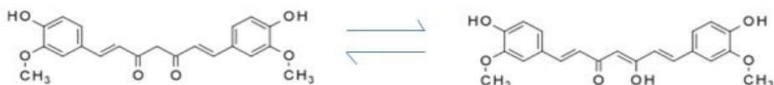
Nama Kimia	Rumus Molekul	Berat Molekul
<i>Curcumin</i> ( <i>Diferuloyl Methane</i> )	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>	368
<i>Demethoxy curcumin</i> ( <i>p-Hydroxy-cinnamoylferuloyl-methane</i> )	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub>	338
<i>Bis-demethoxy curcumin</i> ( <i>pp'-Dihydroxydicinnamoyl-methane</i> )	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	308

Beberapa karakteristik *Curcumin* berdasarkan kelarutan dan kestabilannya terhadap pH, air dan suhu diantaranya sebagai berikut:

- 1) *Curcumin* memiliki titik leleh 176-177°C, membentuk garam coklat kemerahan dengan alkali (Bagchi, 2015).
- 2) 90% *curcumin* terdekomposisi sangat cepat pada larutan pH netral. Peningkatan stabilitas *curcumin* terjadi pada pH asam, yang diakibatkan oleh adanya hubungan struktur diene. Namun ketika pH diatur menjadi netral, proton kemudian terlepas dari struktur *curcumin* yang mengakibatkan rusaknya struktur *curcumin* (Kumavat, et al., 2013).

Secara kimia, kurkumin adalah *bis- $\alpha,\beta$ -unsaturated  $\beta$ -diketone* (biasa disebut *diferuloylmethane*), yang menunjukkan tautomerisme keto-enol yang memiliki bentuk keto yang dominan dalam larutan asam dan netral dan bentuk enol stabil dalam medium alkalin. Kurkumin komersial mengandung kira-kira 77% *diferuloylmethane*, 17% *demethoxycurcumin*, dan 6% *bisdemethoxycurcumin* (Anand, et al., 2007).

Bentuk Keto mendominasi pada kondisi larutan asam dan netral (pH 3-7). Saat kondisi ini, kurkumin sebagai donor atom H. Bentuk Enol mendominasi pada kondisi larutan basa (pH 8). Saat kondisi ini, kurkumin sebagai donor elektron (Kumavat, et al., 2013).



**Gambar 2** Bentuk Tautomer Kurkumin; bentuk Keto (a) dan bentuk Enol (b) (Kumavat, et al., 2013)

Kurkumin rentan terhadap perubahan pH dan cahaya. Kurkumin terdegradasi menjadi *trans-6-(40-hydroxy-30-methoxyphenyl)-2, 4-dioxo-5-hexanal*, asam ferulat, *feruloylmethane* dan *vanillin*. *Feruloylmethane* dengan cepat membentuk warna produk kuning sampai kuning kecoklatan. Di bawah kondisi asam, degradasi kurkumin kurang dari 20% dari total kurkumin. Pada pH<1, larutan memiliki warna kuning-oranye; pada pH 1-7, kelarutan kurkumin di dalam sgyfdgair

sangat rendah dan larutannya berwarna kuning; dan pH >7,5 warna larutan berubah dari kuning menjadi merah. Kurkumin akan terdegradasi <1% kurkumin (dari keseluruhan total kurkumin) pada kondisi tanpa cahaya dalam 6 jam; sedangkan pada kondisi terkena cahaya, kurkumin akan terdegradasi 40% (Kumavat, et al., 2013).

Sebagai zat pewarna alami, kurkumin diketahui tidak stabil dan telah diganti dengan pewarna sintetis yang lebih stabil. Jelas bahwa kurkumin tidak sesuai untuk digunakan dalam banyak produk karena kurkumin kehilangan warnanya pada penyimpanan dalam kondisi basa. Larutan kurkumin dalam metanol yang disimpan pada suhu  $-70^{\circ}\text{C}$  selama satu tahun, tidak mempengaruhi kandungan kurkuminnya. Selain itu, besarnya konsentrasi kurkumin dalam metanol juga tidak mempengaruhi laju degradasi kurkumin itu sendiri pada pH > 7. Sedangkan, pada pH <7, reaksi degradasi terjadi ~100 kali lebih cepat. Hal ini mungkin disebabkan kelarutan kurkumin yang rendah dalam kisaran pH tersebut (Tonnesen & Karlsen, 1985). Kurkumin dalam larutan encer mengalami reaksi degradasi hidrolitik. Untuk mendapatkan stabilitas optimum dari kurkumin pH harus dipertahankan di bawah 7.

Pada kunyit, senyawa yang memiliki aktifitas antimikroba adalah kurkumin. Hal ini karena kurkumin merupakan senyawa fenolik yang mekanisme kerjanya mirip dengan senyawa fenolik lainnya yang berfungsi sebagai antimikroba. Fenol dan senyawa turunannya telah terbukti mempunyai sifat bakteristatik dan bakterisidal sehingga sering digunakan sebagai desinfektan. Senyawa fenol bersifat aktif terhadap sel vegetatif bakteri, tetapi tidak terhadap spora bakteri. Senyawa kimia utama yang bersifat antimikroba seperti fenol dan senyawa turunannya terbukti sebagai antibakteri dengan cara merusak dinding sel yang mengakibatkan lisis atau menghambat pembentukan komponen dinding sel pada sel yang sedang tumbuh, mengubah permeabilitas membran sitoplasma sehingga menyebabkan kebocoran nutrisi dari dalam sel, denaturasi

protein sel, dan menghambat kerja enzim di dalam sel. Keaktifan fenol menurun dengan adanya pengenceran dan reaksi dengan senyawa organik lain. Senyawa fenol sangat aktif pada pH asam. (Abdullatif, 2016).

Flavonoid merupakan golongan terbesar senyawa fenol yang mempunyai sifat meningkatkan permeabilitas sel, dapat menghambat mikroorganisme karena kemampuannya membentuk senyawa kompleks dengan protein, dengan rusaknya protein maka aktifitas metabolisme mikroba menjadi terganggu sehingga mengakibatkan kematian mikroba. Pembentukan kompleks menyebabkan rusaknya membran sel karena terjadi perubahan permeabilitas sel dan hilangnya kandungan isi sel di dalam sitoplasma yang mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan sel atau matinya sel mikroba (Abdullatif, 2016).

## **II.2 *Natural Deep Eutectic Solvents (NADES)***

Beberapa tahun yang lalu, kelompok penelitian mengembangkan *green solvents* jenis baru, pelarut eutektik alami (NADES). NADES ini adalah cairan yang terbuat dari metabolit utama (misalnya gula, alkohol gula, asam organik, asam amino, dan amina) yang terikat bersama oleh interaksi antarmolekul yang kuat, terutama ikatan hidrogen. Telah terbukti banyak keuntungan dibandingkan pelarut konvensional yang saat ini digunakan untuk ekstraksi, misalnya volatilitas yang dapat diabaikan, viskositas yang dapat disesuaikan, dan kekuatan pelarut yang tinggi (Paulucci, et al., 2013). Sebagai contoh, beberapa NADES telah menunjukkan kemampuan pelunakan rutin yang sangat tinggi, dalam beberapa kasus sebanyak 12.000 kali lebih tinggi daripada air. Dari perspektif lingkungan dan ekonomi, NADES juga menyajikan keuntungan besar mengenai tingkat degradabilitas, keberlanjutan, biaya rendah dan persiapan sederhana. Semua sifat ini menunjukkan bahwa NADES sebagai pelarut ekstraksi untuk produk alami dan aplikasi potensial mereka di bidang kesehatan seperti makanan, farmasi dan kosmetik (Dai et al., 2016).

Meskipun memiliki viskositas tinggi, NADES masih berwujud cair pada suhu kamar (25 °C) dan bahkan pada suhu rendah (<0 °C). Viskositas NADES menurun secara signifikan dengan penambahan sejumlah kecil air. Selain itu, NADES memiliki cakupan polaritas dalam rentang yang lebar, mulai lebih polar daripada air hingga polaritas sama dengan metanol. NADES terbukti menjadi pelarut yang sangat baik untuk berbagai metabolit dengan polaritas rendah sampai menengah yang tidak atau sukar larut dalam air. Makromolekul seperti DNA, protein dan polisakarida juga larut dalam NADES. NADES yang tidak beracun dan ramah lingkungan digunakan untuk berbagai aplikasi pada bidang makanan, kosmetik, agrokimia dan industri farmasi sebagai media baru *Green Technology* (Dai, et al., 2013).

**Tabel 2** Daftar ILs dan DES Alami (Choi, et al., 2011)

<b>Kombinasi</b>	<b>Molar Rasio</b>
Asam sitrat: <i>Choline chloride</i>	1:2, 1:3
Asam maleat: <i>Choline chloride</i>	1:1, 1:2, 1:3
Asam maleat: <i>Choline chloride</i>	1:1, 1:2, 1:3
<i>Aconitic acid</i> : <i>Choline chloride</i>	1:1
Glisin: <i>Choline chloride</i> :Air	1:1:1
Fruktosa: <i>Choline chloride</i> :Air	1:1:1
Sukrosa: <i>Choline chloride</i> : Air	1:1:1
Asam sitrat: <i>Proline</i>	1:1, 1:2, 1:3
Asam maleat:Glisin	1:1
Asam maleat:Fruktosa	1:1
Asam maleat:Sukrosa	1:1
Asam sitrat:Glisin	2:1
Asam sitrat:Trihalose	2:1
Asam sitrat:Sukrosa	1:1
Asam maleat:Glisin	4:1



Asam maleat:Sukrosa	1:1
Glisin:Fruktosa	1:1
Fruktosa:Sukrosa	1:1
Glisin:Sukrosa	1:1
Sukrosa:Glisin:Fruktosa	1:1:1

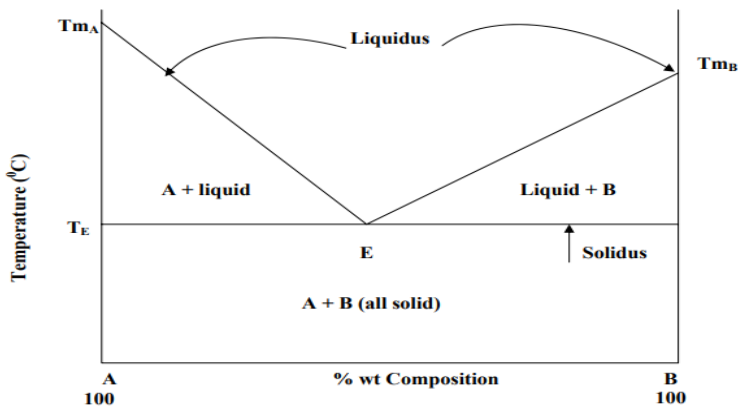
NADES adalah suatu campuran berbentuk liquid yang merupakan campuran dari senyawa-senyawa metabolit primer seperti gula, gula alkohol, poli-alkohol, basa organik, asam organik, dan asam amino (Choi, et al., 2011). Berdasarkan senyawa-senyawa penyusunnya, NADES dikelompokkan dalam tipe-tipe sebagai berikut (Dai, et al., 2013):

- 1) Cairan ionik, terdiri dari asam-asam organik (asam sitrat, asam maleat, asam laktat) dan senyawa-senyawa basa (*choline chloride*, *betaine chloride*, dan *betaine*).
- 2) NADES netral, tidak ada konstituen ionik, seperti campuran *polyalcohols* (gliserol, glisin, 1-2-propandiol).
- 3) NADES yang bersifat asam, terdiri dari senyawa-senyawa netral (glukosa, fruktosa, sukrosa, maltosa, *trehalose*) dan senyawa-senyawa asam.
- 4) NADES yang bersifat basa, yang terdiri dari senyawa-senyawa netral dan senyawa-senyawa basa.
- 5) NADES yang bersifat amfoter, kombinasi dari asam amino ( $\alpha$ -*Proline*,  $\beta$ -*Alanine*) dan gula, *polyalcohol*, atau senyawa-senyawa asam.

Campuran eutektik didefinisikan sebagai campuran dari dua komponen yang biasanya tidak berinteraksi pada perbandingan mol tertentu dan mampu menghambat proses kristalisasi satu sama lain sehingga menghasilkan sebuah sistem yang memiliki titik leleh yang lebih rendah dari komponen individunya.

Pembentukan campuran eutektik biasanya dipengaruhi oleh beberapa faktor (Hakeem & Otito, 2008) ,yaitu:

- Komponen lebih mudah tercampur dalam fase liquid dan sebagian besar tidak terampur pada fase padatan
- Kontak yang konsisten antar komponen pembentuk campuran eutektik dibutuhkan untuk penurunan titik leleh secara kontak induksi
- Komponen pembentuk termasuk dalam komponen kimia yang dapat berinteraksi membentuk ikatan fisik yang bersifat intermolekuler seperti ikatan hydrogen
- Molekul yang sesuai dengan persamaan Vant Hoff yang dimodifikasi dapat membentuk campuran eutektik.



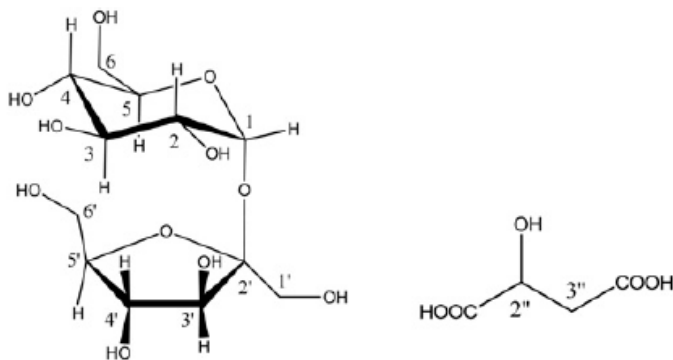
**Gambar 3** Diagram fase sistem eutektik (Hakeem & Otito, 2008)

Diagram fase (**Gambar 3**) mendiskripsikan hubungan antara komposisi dan suhu untuk menentukan fase dari kedua unsur sesuai dengan diagram. Diagram fase terdiri dari suhu – waktu dari masing-masing komponen. Ketika komponen A dan B dicampur pada perbandingan konsentrasi tertentu (0-100%), dan dipanaskan sampai seluruh komponen melebur, didapatkan titik lebur campuran yang lebih rendah dibandingkan suhu peleburan

komponen murni. Titik lebur terendah yang ditunjukkan oleh titik E (**Gambar 3**) didefinisikan sebagai suhu eutektik dan komposisi pada campuran tersebut disebut sebagai komposisi eutektik, dan titik eutektik untuk kedua suhu dan komposisi (Hakeem & Otito, 2008).

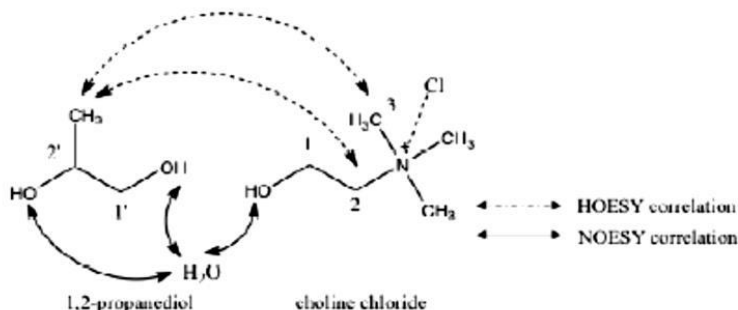
### II.3 Struktur Natural Deep Eutectic Solvent (NADES)

*Natural Deep Eutectic Solvent* (NADES) adalah *liquid* kristal yang mana molekul-molekulnya terbentuk melalui ikatan hidrogen dan ikatan-ikatan fisika intermolekuler (Dai, et al., 2013). NADES membentuk struktur “supramolekul” yang berbeda dari senyawa-senyawa penyusunnya (Choi, et al., 2011). Struktur supramolekul NADES tersebut ditunjukkan oleh (Choi, et al., 2011) menggunakan  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -*Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy* ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY) pada NADES *sucrose-malic acid* (1:1). Hasil NOESY menunjukkan adanya interaksi molekuler antara proton-2'' dan -3'' dari *malic acid* dengan proton-1 dan -2' dari *sucrose* (Choi, et al., 2011).



**Gambar 4** Penomoran pada sukrosa (kiri) dan malic acid (kanan) pada  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -*Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy* ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY) (Choi, et al., 2011)

*Heteronuclear Overhauser Spectroscopy* (HOESY) dan  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY digunakan untuk mengetahui korelasi intermolekuler dan intramolekuler yang terbentuk pada NADES 1-2-propanediol choline chloride-water (1:1:1) (Dai, et al., 2013).



**Gambar 5** Penomoran pada 1-2-propanediol (kiri) dan choline chloride (kanan) pada HOESY dan  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY (Dai, et al., 2013).

Analisa HOESY menunjukkan bahwa terdapat interaksi antara proton dari gugus metil dari 1-2-propanediol dengan dari karbon pada gugus metil dan pada *methylene* (yang terhubung dengan nitrogen) dari *choline chloride*. Interaksi tersebut menjelaskan bahwa proton dan gugus hidroksil dari 1-2-propanediol kemungkinan membentuk ikatan hidrogen dengan *choline chloride* (Dai, et al., 2013).

Spektra analisa  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY juga menunjukkan adanya interaksi kuat antara proton dari gugus hidroksil dengan *choline chloride*, 1-2-propanediol, dan air. Ikatan hidrogen terbentuk antara gugus-gugus hidroksil dari ketiga senyawa tersebut (*choline chloride*, 1-2-propanediol, dan air). Hasil HOESY dan  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY menunjukkan bahwa air juga turut berperan dalam terbentuknya “supramolekul” dari NADES. Fenomena yang analog juga ditunjukkan oleh NADES, *prolinemalic acid-water* (Dai, et al., 2013).

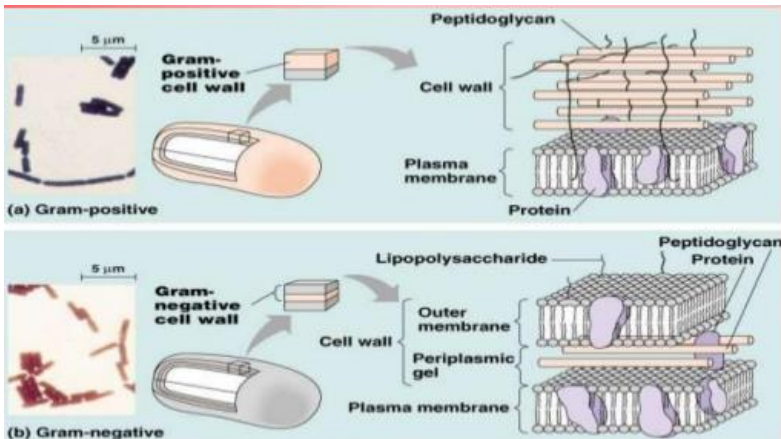
Dalam hal kelarutan senyawa target dalam NADES, kelarutan suatu senyawa dalam NADES dimungkinkan akibat adanya ikatan hidrogen yang terbentuk antara senyawa target dan NADES. Fenomena tersebut telah ditunjukkan untuk *quercetin* dengan *xylitol-choline chloride-water* (1:2:3) menggunakan *High-Resolution Magic Angle Spinning* (HR-MAS) NMR (Dai, et al., 2013).

#### **II.4 Senyawa Antimikroba**

Senyawa antimikroba adalah suatu komponen yang mampu menghambat pertumbuhan dan aktivitas mikroba. Senyawa ini dapat bersifat bakterisidal (membunuh bakteri), bakteristatik (menghambat pertumbuhan bakteri), fungisidal (membunuh kapang), fungistatik (menghambat pertumbuhan kapang), ataupun germsidal (menghambat germinasi spora bakteri). Senyawa tersebut dapat dikelompokkan menjadi senyawa antibakteri dan antikapang. Beberapa senyawa kimia utama yang bersifat antimikroba, yaitu senyawa fenolik, halogen, minyak atsiri, zat warna, asam dan basa (Pandiangan, 2008)

Senyawa kimia yang digunakan untuk mencegah kerusakan pangan memiliki sifat antiseptik pada kondisi tertentu. Jenis senyawa kimia yang banyak digunakan sebagai bahan pengawet karena mempunyai daya antimikroba antara lain adalah sulfit, nitrit dan nitrat. Senyawa antimikroba alami yang berasal dari tanaman antara lain: fitoaleksin, asam organik, minyak atsiri, senyawa fenolik, pigmen dan senyawa kerabatnya. Kemampuan suatu zat anti mikroba dalam menghambat pertumbuhan mikroba dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya: 1) konsentrasi zat antimikroba; 2) suhu lingkungan; 3) waktu penyimpanan; 4) sifat-sifat mikroba meliputi jenis, jumlah, umur, dan keadaan mikroba; 5) sifat-sifat fisik dan kimia makanan termasuk kadar air, pH, jenis dan jumlah senyawa didalamnya. Beberapa faktor yang mempengaruhi aktifitas antimikroba dalam pengolahan pangan antara lain: temperatur, keasaman (pH), garam dan gula (Pandiangan, 2008).

Salah satu dari mikroba yang kami pelajari di penelitian ini adalah bakteri. Kebanyakan bakteri berukuran sangat kecil, hanya beberapa mikrometer ( $10^{-6}$  meter). Bentuk bakteri pada umumnya adalah batang (*bacillus*) atau bulat (*coccus*). Kriteria yang membedakan karakter bakteri adalah berdasarkan struktur dinding sel. Bakteri dengan dinding sel tipis dan membran luar tebal adalah bakteri Gram negatif, sementara bakteri dengan dinding sel tebal dan membran luar tipis adalah bakteri Gram positif (Thiel, 1999). Berikut adalah gambar struktur bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif.



**Gambar 6** Struktur Dinding Sel Bakteri (a) Gram-positif dan (b) Gram-negatif (Prescott, 2002)

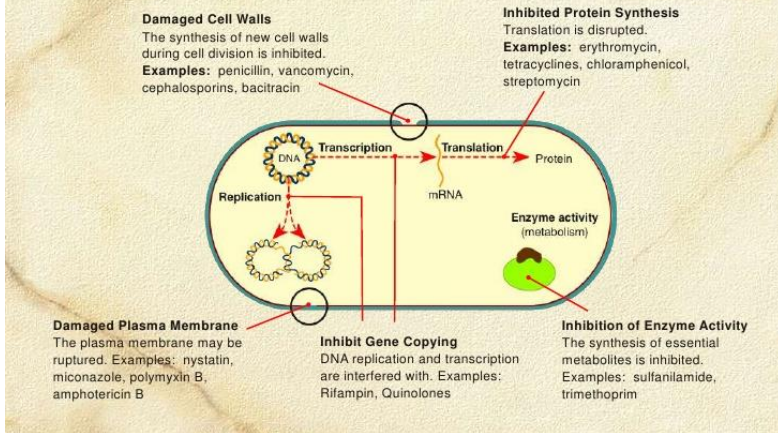
Peptidoglikan adalah elemen struktur penyusun dinding sel di semua bakteri. Dinding sel bakteri Gram positif tersusun 95% peptidoglikan, sementara bakteri Gram negatif hanya tersusun 5-10%. Peptidoglikan pada bakteri Gram positif terbuat dari susunan polisakarida yang terdiri dari *N-acetylmuramic acid* (NAM) dan *N-acetylglucosamine* (NAG) (Qasba, et al., 2008). Bakteri Gram negatif punya dinding sel yang jauh lebih kompleks.

Konstituen yang paling tidak biasa dari membran luar bakteri Gram negatif adalah lipopolisakarida (LPS). LPS mengandung lipid dan karbohidrat yang terdiri dari tiga bagian: 1. Lipid A, 2. polisakarida inti, dan 3. rantai samping O. Daerah lipid A mengandung dua turunan gula *glucosamine*, masing-masing dengan tiga asam lemak dan fosfat atau pirofosfat. Wilayah ini terletak di membran luar dan bagian-bagian sisanya dari permukaan. Wilayah kedua atau polisakarida inti bergabung dengan lipid A dan wilayah ketiga atau rantai samping O merupakan rantai polisakarida memanjang keluar dari inti. Rantai samping O dikenal dengan antibodi, dimana bakteri Gram negatif dapat mempertahankan pertahanan diri dengan mengubah sifat rantai samping O mereka untuk menghindari deteksi. Polisakarida inti mengandung gula dan fosfat bermuatan, LPS, berkontribusi terhadap muatan negatif pada permukaan bakteri. Lipid A adalah konstituen utama membran luar, dan LPS membantu menstabilkan struktur membran. Lipid A sering terkontaminasi oleh racun lingkungan dan akibatnya LPS dapat bertindak sebagai endotoksin dan menyebabkan beberapa gejala yang muncul pada infeksi bakteri Gram negatif. Fungsi membran luar berfungsi sebagai penghalang dan pelindung. Ini mencegah atau memperlambat masuknya garam empedu, antibiotik, dan zat beracun lainnya yang mungkin membunuh bakteri (Prescott, 2002).

Dikarenakan bakteri Gram negatif mempunyai membran luar ekstra, maka ketika terjadi lisis ada perbedaan mekanisme antara bakteri Gram negatif dan bakteri Gram positif. Menurut (Prochnow, et al., 2016), terjadinya lisis dikarenakan *cold atmospheric plasma* dapat merusak ikatan-ikatan penting di dinding sel (peptidoglikan) pada bakteri Gram positif dan degradasi oksidatif membran lipid pada bakteri Gram negatif. Gangguan pada permukaan luar sel ini mengakibatkan rusaknya komponen-komponen selular, seperti potassium, asam nukleat dan protein. Setelah dinding sel rusak, spesies reaktif dapat penetrasi masuk ke bagian dalam sel dan merusak protein intraselular dan DNA (Mai-Prochnow, et al., 2014).

# How Antimicrobial Drugs Work

Antimicrobial drugs **disrupt** the functioning of a bacterial cell in the following ways:



**Gambar 7** Mekanisme Lisis pada Bakteri

(Sumber: [https://www.slideshare.net/doc\\_sawyer/the-nature-of-disease-controlling-disease-3311809](https://www.slideshare.net/doc_sawyer/the-nature-of-disease-controlling-disease-3311809))

Menurut (Prescott, 2002), terdapat beberapa faktor yang dapat mempengaruhi pertumbuhan bakteri:

## 1. Temperatur

Setiap spesies mikroba membutuhkan rentang suhu yang ditentukan oleh sensitivitas panas dari enzim, membran, ribosom, dan komponen lainnya. Sebagai akibatnya, pertumbuhan mikroba memiliki ketergantungan suhu yang cukup khas dengan suhu kardinal yang berbeda — minimum, maksimum, dan optimal. Suhu pertumbuhan minimum adalah



suhu terendah dimana pertumbuhan akan terjadi; suhu pertumbuhan maksimum adalah suhu tertinggi dimana pertumbuhan akan terjadi; dan suhu pertumbuhan optimal adalah suhu di mana laju reproduksi seluler paling cepat terjadi. Suhu optimum untuk pertumbuhan mikroorganisme tertentu berkorelasi dengan suhu habitat normal mikroorganisme.

*Boiling* merupakan salah satu cara termudah untuk menghilangkan bakteri berbahaya. Namun, tidak semua bakteri sama-sama sensitif terhadap suhu tinggi. Beberapa bakteri dapat bertahan hidup pada suhu air mendidih meskipun mereka tidak dapat tumbuh. Bakteri ini disebut *thermoduric*. Banyak pembentuk spora (seperti *B. subtilis*) dapat bertahan mendidih selama 15 menit karena endosporanya yang resisten. Dengan demikian, suhu dan spesies bakteri akan mempengaruhi desinfeksi spesimen tertentu. Ini penting untuk diketahui ketika mencoba membunuh bakteri patogen dengan suhu panas.

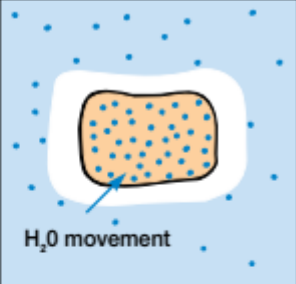
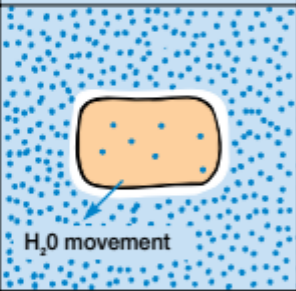
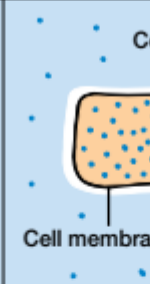

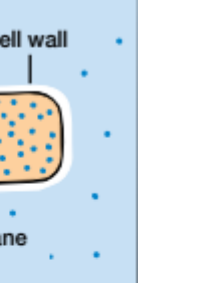
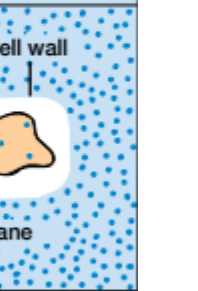
## 2. pH

Tidak mengherankan bahwa pH secara dramatis mempengaruhi pertumbuhan bakteri. pH mempengaruhi aktivitas enzim-terutama yang terlibat dalam biosintesis dan pertumbuhan. Setiap spesies mikroba memiliki kisaran pertumbuhan pH yang pasti dan pH optimum pertumbuhan berbeda. *Acidophiles* memiliki pertumbuhan yang optimal antara pH 0,0 hingga 5,5; *neutrophiles* antara 5,5 hingga 8,0; dan *alkalophiles* antara 8,5 hingga 11,5.

## 3. Tekanan Osmotik

Karena bakteri terpisahkan dari lingkungannya oleh membran plasma selektif, mereka dapat dipengaruhi oleh perubahan tekanan osmotik atau ketersediaan air di sekitarnya. Tekanan osmotik adalah gaya yang terjadi ketika dua larutan dari konsentrasi zat terlarut yang berbeda dipisahkan oleh membran yang hanya dapat diresap ke pelarut. Pelarutnya adalah cairan, biasanya air, yang melarutkan suatu zat (zat terlarut). Jika bakteri ditempatkan dalam larutan hipotonik (kadar terlarut rendah, kadar air tinggi), air akan masuk ke sel dan

menyebabkannya meledak. Kebanyakan bakteri memiliki dinding sel yang kaku yang mempertahankan bentuk dan integritas sel; dengan demikian, kondisi hipotonik tidak berbahaya bagi bakteri ini. Ketika bakteri ditempatkan dalam larutan hipertonik (zat terlarut tinggi, kadar air lebih rendah), air akan keluar dari sel dan membran plasma menyusut jauh dari dinding, proses yang dikenal sebagai plasmolisis.

Solution	Before	After
Hypotonic	 <p>H<sub>2</sub>O movement</p>	 <p>Cell wall</p> <p>Cell membrane</p>
Hypertonic	 <p>H<sub>2</sub>O movement</p>	 <p>Cell wall</p> <p>Cell membrane</p>
Isotonic	 <p>Cell wall</p> <p>Cell membrane</p>	 <p>H<sub>2</sub>O movement</p>

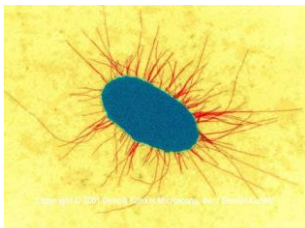
**Gambar 8** Efek Tekanan Osmotik pada Sel Bakteri  
(Sumber: Prescott, 2002)

4. Zat Antimikroba

Banyak faktor mempengaruhi efektivitas zat antimikroba. Efisiensi *microbicial* (untuk membunuh) atau *microbiostatic* (untuk menghambat) bahan kimia sering ditentukan sehubungan dengan kemampuannya untuk mencegah pertumbuhan mikroba. Lebih khusus lagi, efisiensi mikrobisida kimia sering ditentukan sehubungan dengan fenol dan dikenal sebagai koefisien fenol (PC). Koefisien fenol dihitung dengan membagi pengenceran tertinggi antimikroba, yang membunuh semua organisme setelah inkubasi selama 10 menit, dengan pengenceran fenol tertinggi yang memiliki karakteristik yang sama. Bahan kimia yang memiliki koefisien fenol lebih besar dari 1 lebih efektif daripada fenol, dan mereka yang memiliki koefisien fenol kurang dari 1 kurang efektif daripada fenol. Namun, perbandingan ini hanya boleh digunakan untuk senyawa mirip fenol yang tidak memberikan efek bakteriostatik dan tidak dinetralisasi oleh media subkultur yang digunakan.

**II.4.1 Bakteri *Escherichia coli***

*Escherichia coli* merupakan bakteri Gram negatif berbentuk batang pendek yang memiliki panjang sekitar 2  $\mu\text{m}$ , diameter 0,7  $\mu\text{m}$ , lebar 0,4-0,7 $\mu\text{m}$  dan bersifat anaerob fakultatif. *E. coli* membentuk koloni yang bundar, cembung, dan halus dengan tepi yang nyata (Kusuma, 2010). *E. coli* dapat dilihat pada **Gambar 9**.



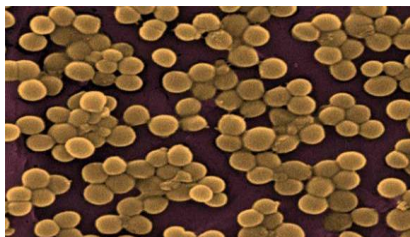
**Gambar 9** Bakteri *E. Coli* (Kusuma, 2010)

*E. coli* adalah anggota flora normal usus. *E. coli* berperan penting dalam sintesis vitamin K, konversi pigmen-pigmen empedu, asam-asam empedu dan penyerapan zat-zat makanan. *E. coli* termasuk ke dalam bakteri heterotrof yang memperoleh makanan berupa zat organik dari lingkungannya karena tidak dapat menyusun sendiri zat organik yang dibutuhkannya. Zat organik diperoleh dari sisa organisme lain. Bakteri ini menguraikan zat organik dalam makanan menjadi zat anorganik, yaitu  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , energi, dan mineral. Di dalam lingkungan, bakteri pembusuk ini berfungsi sebagai pengurai dan penyedia nutrisi bagi tumbuhan. *E. coli* menjadi patogen jika jumlah bakteri ini dalam saluran pencernaan meningkat atau berada di luar usus. *E. coli* menghasilkan enterotoksin yang menyebabkan beberapa kasus diare. *E. coli* berasosiasi dengan enteropatogenik menghasilkan enterotoksin pada sel epitel (Kusuma, 2010).

#### **II.4.2 Bakteri *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* merupakan bakteri Gram positif berbentuk bulat berdiameter 0,7-1,2  $\mu\text{m}$ , tersusun dalam kelompok-kelompok yang tidak teratur seperti buah anggur, fakultatif anaerob, tidak membentuk spora, dan tidak bergerak (**Gambar 10**). Bakteri ini tumbuh pada suhu optimum 37 °C, tetapi membentuk pigmen paling baik pada suhu kamar (20-25 °C). Koloni pada perbenihan padat berwarna abu-abu sampai kuning keemasan, berbentuk bundar, halus, menonjol, dan berkilau. Lebih dari 90% isolat klinik menghasilkan *S.aureus* yang mempunyai

kapsul polisakarida atau selaput tipis yang berperan dalam virulensi bakteri (Kusuma, 2010). Bakteri *Staphylococcus aureus* dapat dilihat pada **Gambar 10**.



**Gambar 10** Bakteri mikroskopis *S. Aureus* (Kusuma, 2010)

## II.5 Studi Hasil Penelitian Sebelumnya

Baru-baru ini, telah dikembangkan jenis pelarut baru berdasarkan DES yang merupakan campuran eutektik bertitik leleh lebih rendah dari masing-masing komponen penyusunnya. Campuran terbentuk dari senyawa-senyawa metabolit primer yang umum di alam, yaitu gula, basa dan asam organik, asam amino, protein, alkohol, polialkohol, dll. Mengingat komponen-komponen penyusunnya telah tersedia secara alamiah, maka diberi NADES – *Natural Deep Eutectic Solvent* (Choi, et al., 2011). Kemudahan pembuatan NADES yang terdiri dari senyawa-senyawa baku berharga murah, dan ketersediaannya secara alami dan melimpah, sifatnya yang aman; menjadikan NADES memiliki sejumlah keunggulan dibandingkan *green solvent* lainnya (Dai, et al., 2013). Walaupun telah dilakukan penelitian pada NADES, masih terdapat kekurangan informasi tentang isu-isu praktis yang berkaitan dengan aplikasi mereka sebagai pelarut terutama untuk produk-produk alami senyawa bioaktif berskala komersial.

Aplikasi dari NADES untuk ekstraksi metabolit sekunder telah dilaporkan serta penerapannya dalam pengolahan biodiesel. Mikro atau makro-molekul bisa dilarutkan dengan NADES. Misalnya, diketahui NADES memberikan kelarutan yang baik dari pada serangkaian senyawa bioaktif seperti rutin, quercetin, asam

sinamat, taxol, carthamin, ginkgolide B serta beberapa makromolekul seperti gluten, DNA, dan pati di NADES dilaporkan (Dai, et al., 2013). NADES seperti asam prolin-malat (PMH), sukrosa-kolin klorida (seperti), glukosa-kolin klorida (GCH), sorbitol-kolin klorida (Soch), 1,2-propanediol-kolin klorida (PCH), fruktosa-glukosa-sukrosa (FGSH), dan laktat asam-glukosa (LGH) untuk ekstraksi fenolat seperti cartomin dan carthamin dari safflower (*Flos Carthami*), corolla dari *Carthamus tinctorius* L. telah ditunjukkan oleh (Dai et al., 2013). Oleh karena itu, NADES menawarkan keuntungan jelas atas DES sintetis terutama untuk bahan makanan, kosmetik, dan aplikasi farmasi. Hasil ini menunjukkan perlunya penelitian lebih lanjut tentang aplikasi dari NADES sebagai pelarut ekstraksi ramah lingkungan. Berikut adalah tabel beberapa penelitian yang telah dilakukan sebelumnya.

**Tabel 3** Penelitian-Penelitian Sebelumnya

<b>Penulis (tahun)</b>	<b>Tujuan Penelitian</b>	<b>Hasil</b>
(Pandiangan, 2008)	Mengetahui stabilitas antimikroba ekstrak temulawak terhadap mikroba patogen	Pada pengujian stabilitas ekstrak temulawak dengan konsentrasi terpilih 10% untuk pelarut etanol dan 5% untuk etil asetat dinyatakan stabil dimana diameter penghambatan terhadap mikroba uji adalah besar. Ekstrak dengan pelarut etanol

		<p>yang diberi pemanasan mempunyai diameter penghambatan lebih besar dibanding dengan pelarut etil asetat terhadap bakteri <i>B. cereus</i> dan <i>E. coli</i>. Semakin tinggi suhu pemanasan dan semakin lama pemanasan, diameter penghambatan semakin kecil. Semakin tinggi konsentrasi garam dan gula yang digunakan, diameter penghambatan akan semakin besar.</p>
(Dai, et al., 2013)	Mengetahui aplikasi NADES untuk pelarut produk-produk alami senyawa bioaktif	NADES dapat melarutkan mikromolekul seperti taxol, quercetin, carthamin dan makromolekul seperti pati, gluten, dan DNA.

Cut Warnaini (2013)	Mengetahui efek antibakteri ekstrak kunyit terhadap pertumbuhan bakteri <i>Bacillus sp</i> dan <i>Shigella dysentriae</i>	Ekstrak kunyit menghambat pertumbuhan bakteri <i>Bacillus sp</i> dan <i>Shigella dysentriae</i> dengan kategori hambatan lemah
(Opsvik, et al., 2015)	Mengetahui efek pengenceran NADES dan pengaruh pada aktivitas mikroorganisme	Pengenceran larutan NADES hanya sampai pada 1:200 agar bakteri rentan mati. Penambahan THPP (Tetra (p-hydrophenyl) propine) pada NADES lebih optimal mematikan bakteri daripada hanya larutan NADES



## III METODE PENELITIAN

### III.1 Alat dan Bahan

#### III.1.1 Alat

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini adalah peralatan gelas sederhana, neraca analitik, *hot plate*, *petridish*, spektrofotometer UV-Vis, *autoclave*, inkubator, *colony counter*, *ultrasonic bath*.

#### III.1.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah serbuk kurkuminoid hasil sintesis (8.20354.0010, Merck) sebagai senyawa standard. Bahan-bahan pembuat NADES: D(-)-Fructose ( $\geq 99,0\%$ , 1.04007.0250, Merck); D(+)-Glucose (1.08337.1000, Merck); Saccharose (K12329551, Merck); DL-Malic Acid ( $\geq 99,5\%$ , 1.00382.0250, Merck); Nutrient Broth Agar; Nutrient Broth cair; *Staphylococcus aureus*; *Escherichia coli*; dan *Aquadest*.

### III.2 Variabel Penelitian

#### III.2.1 Variabel Tetap

1. Suhu pencampuran NADES (70 °C).
2. Kecepatan pengadukan (350 rpm).
3. Suspensi bakteri uji dengan kepadatan  $10^8$  sel/mL sebanyak 1 mL dan ditambah 1 mL ekstrak uji.

#### III.2.2 Variabel Bebas

1. NADES yang diujikan: *malic acid*-sukrosa-air (MAS-H<sub>2</sub>O = 1:1:18); *fructose*-glukosa-air (FG-H<sub>2</sub>O = 1:1:7); *fructose*-sukrosa-air (FS-H<sub>2</sub>O = 2:1:15).
2. Konsentrasi *curcuminoids* terlarut yang akan diujikan: 0 mM; 2 mM; 2,25 mM; 2,5 mM; 2,75 mM; 3 mM; 3,25 mM; 3,5 mM; 3,75 mM; dan 4 mM.
3. Mikroba: bakteri gram negatif *Escherichia coli* dan bakteri gram positif *Staphylococcus aureus*.

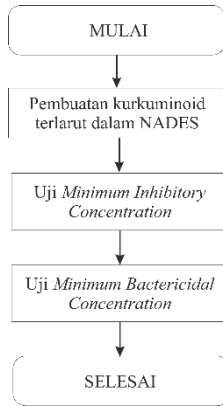
### III.2.3 Variabel Respon

1. Variabel konsentrasi kurkuminoid dan jenis NADES memberikan daya hambat pertumbuhan bakteri (CFU/mL).

### III.3 Metode Penelitian

Penelitian ini secara umum dibagi menjadi dua tahap: tahap pertama yaitu pembuatan larutan NADES. Selanjutnya, tahap kedua, tahap uji antimikroba menggunakan kurkuminoid (terlarut dalam NADES) pada *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Uji antimikroba ini dilakukan dengan menghitung jumlah koloni bakteri. Mikroba yang diujikan pada tahapan ini adalah mikroba yang berada pada kondisi logaritmik (diketahui dari kurva pertumbuhan).

Tahap uji antimikroba diuji menggunakan kurkuminoid yang dilarutkan dalam tiga jenis NADES yang berbeda (**subbab III.2.2**) yaitu: MAS-H<sub>2</sub>O (1:1:18); FG-H<sub>2</sub>O (1:1:7); dan FS-H<sub>2</sub>O (2:1:15) pada dua jenis mikroba: *E. coli* (gram negatif) dan *S. aureus* (gram positif). Uji dilakukan dengan konsentrasi bakteri yang seragam dengan waktu inkubasi 1x24 jam dan suhu inkubasi 37 °C. Uji antimikroba juga dilakukan terhadap masing-masing komponen murni penyusun NADES, seperti: sukrosa, glukosa, *malic acid*, dan fruktosa tanpa kurkuminoid sebagai blanko. Konsentrasi masing-masing komponen tersebut dibuat pada konsentrasi yang sama, sesuai dengan konsentrasinya di dalam NADES. Kurkuminoid terlarut pada konsentrasi tertentu dalam NADES yang memberikan daya hambat mikroba terbaik (*minimum inhibitory concentration*), selanjutnya digunakan untuk mengetahui konsentrasi minimum pada bakterisida (*minimum bactericidal concentration*).

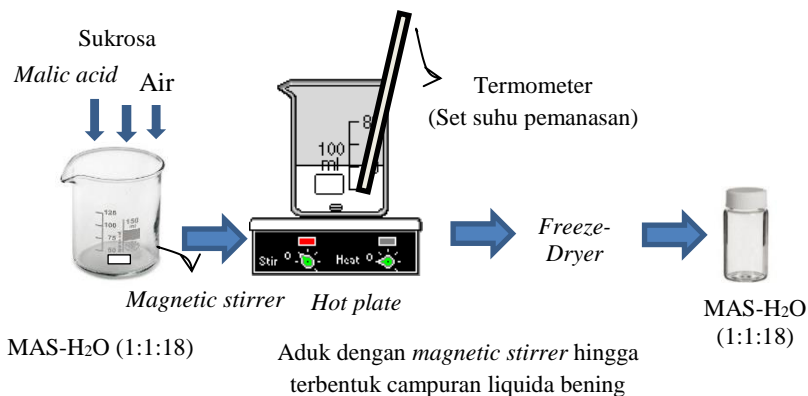


**Gambar 11** Perancangan Penelitian

### **III.3.1 Pembuatan Kurkumin Terlarut dalam *Natural Deep Eutectic Solvents* (NADES)**

#### **III.3.1.1 Pembuatan *Natural Deep Eutectic Solvents* (NADES)**

Semua *Natural Deep Eutectic Solvents* (NADES) yang digunakan dalam penelitian ini dipersiapkan berdasarkan metode yang dilakukan (Dai, et al., 2013). Metode pemanasan dipilih untuk pembuatan NADES. Komponen-komponen penyusun *malic acid* (MA), sukrosa (S), dan air (H<sub>2</sub>O) untuk NADES jenis MAS-H<sub>2</sub>O dicampurkan sesuai dengan mol ratio (1:1:18). Campuran tersebut diaduk pada suhu 70 °C menggunakan *magnetic stirrer* dalam *water bath* hingga diperoleh campuran berbentuk *liquida* yang bening. Jika campuran *liquid* yang diperoleh tidak sesuai dengan rasio mol yang dikehendaki (berlebih), maka perlu dimasukkan ke dalam *freeze-dry* hingga beratnya konstan ( $\pm 3$  hari). Jika campuran *liquid* tetap bening (tidak mengendap, mengkristal ataupun berubah warna) maka campuran *liquid* tersebut disebut sebagai NADES. Lakukan metode diatas untuk masing-masing variabel NADES.



**Gambar 12** Skema pembuatan NADES

### III.3.1.2 Pencampuran Kurkuminoid pada *Natural Deep Eutectic Solvents*

NADES jenis MAS-H<sub>2</sub>O yang telah tercampur dengan sempurna, selanjutnya digunakan untuk melarutkan kurkuminoid. Kurkuminoid pada berbagai konsentrasi (**subbab III.2.2**) diambil untuk dicampur dengan NADES sebanyak 5 mL. Agar kurkuminoid dapat terlarut sempurna dalam NADES, maka dicampur menggunakan *ultrasonic bath* hingga larutan terlihat homogen. Lakukan metode diatas untuk masing-masing variabel kurkuminoid terlarut dalam NADES.

### III.3.2 Uji *Minimum Inhibitory Concentration*

Metode ini bertujuan untuk mengetahui jenis variabel yang dapat memberikan penghambatan bakteri terbaik. Dilakukan pengamatan jumlah sel menggunakan metode spektrofotometri untuk mengetahui nilai absorbansi bakteri *Escherichia coli*.

Pembuatan suspensi bakteri dilakukan dengan menginokulasikan bakteri *Escherichia coli* dari *Nutrient Broth Agar* ke dalam *Nutrient Broth* cair yang disebut kultur bakteri. Selanjutnya kultur bakteri diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Setelah itu, kultur bakteri diukur nilai absorbansinya

menggunakan spektrofotometer UV-Vis hingga didapatkan OD (*Optical Density*) pada kisaran 0,4-0,6 atau setara dengan kepadatan  $10^8$  sel/mL pada panjang gelombang 600 nm.

Tabung reaksi steril diisi dengan suspensi bakteri *Escherichia coli* dengan kepadatan  $10^8$  sel/mL dan ditambahkan ekstrak MAS-H<sub>2</sub>O dengan konsentrasi *curcuminoids* terlarut 2 mM pada perbandingan 1:1, selanjutnya larutan uji divortex. Larutan uji pada jam ke-0 dan ke-24 diukur nilai OD nya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 600 nm. Untuk masing-masing variabel NADES dan kurkumin mengikuti metode yang sama seperti diatas. Lakukan metode diatas untuk mengetahui pengaruh NADES dan kurkumin pada bakteri *Staphylococcus aureus*.

### III.3.3 Uji *Minimum Bactericidal Concentration*

Metode ini bertujuan untuk mengetahui jenis variabel yang dapat memberikan dampak pembasmian bakteri terbaik. Dilakukan perhitungan jumlah sel menggunakan metode *colony counting* untuk mengetahui jumlah bakteri *Escherichia coli* dalam satuan CFU/mL.

Pembuatan suspensi bakteri dilakukan dengan menginokulasikan bakteri *Escherichia coli* dari *Nutrient Broth Agar* ke dalam *Nutrient Broth* cair yang disebut kultur bakteri. Selanjutnya kultur bakteri diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Kultur bakteri diambil 1 mL untuk dilakukan uji TPC menggunakan metode *pour plate*. Pembuatan agar uji dilakukan dengan mencampurkan ekstrak MAS-H<sub>2</sub>O dengan konsentrasi *curcuminoids* terlarut 2 mM ke dalam *Nutrient Broth Agar*. Agar uji dituangkan ke cawan petri, selanjutnya kultur bakteri dituangkan pula ke cawan petri. Cawan petri diputar mengikuti pola angka 8 supaya agar dan kultur tercampur dengan rata. Kultur uji diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Perhitungan jumlah bakteri *Escherichia coli* dilakukan dengan menggunakan *colony counter*. Untuk masing-masing variabel NADES dan kurkumin mengikuti metode yang sama seperti diatas. Lakukan

metode diatas untuk mengetahui pengaruh NADES dan kurkumin pada bakteri *Staphylococcus aureus*.

Pada tahap metode uji MBC dilakukan *total plate count* (TPC) menggunakan *colony counter*. *Plate* dengan lebih dari 250 koloni tidak dapat dihitung dan dianggap sebagai *too numerous to count* (TNTC). *Plate* dengan kurang dari 25 koloni dianggap sebagai *too few to count* (TFTC) (Prescott, 2002).

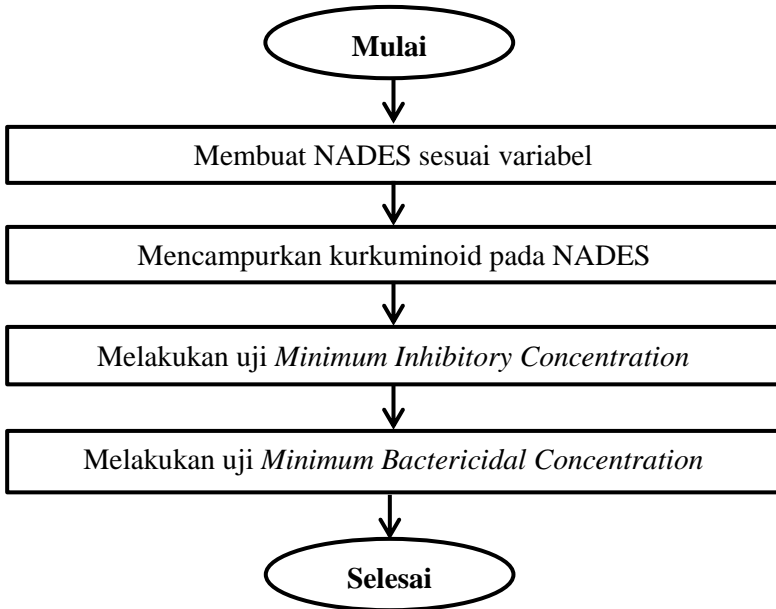
Perhitungan jumlah bakteri (CFU) per milimeter atau gram sampel menurut (Prescott, 2002), dengan cara membagi jumlah koloni dengan faktor dilusi. Jumlah koloni per mL harus sama dengan yang terhitung di *colony counter* dan nilainya tidak lebih dari dua angka di belakang koma. Contohnya, bilamana dilusi  $10^{-6}$  pada *plate* menghasilkan 130 koloni. Kemudian jumlah koloni bakteri dalam 1 mL dari sampel dapat dikalkulasikan sebagai berikut:

$$\text{Koloni/mL} = 130 : 10^{-6} = 1,3 \times 10^8$$

atau  
130.000.000

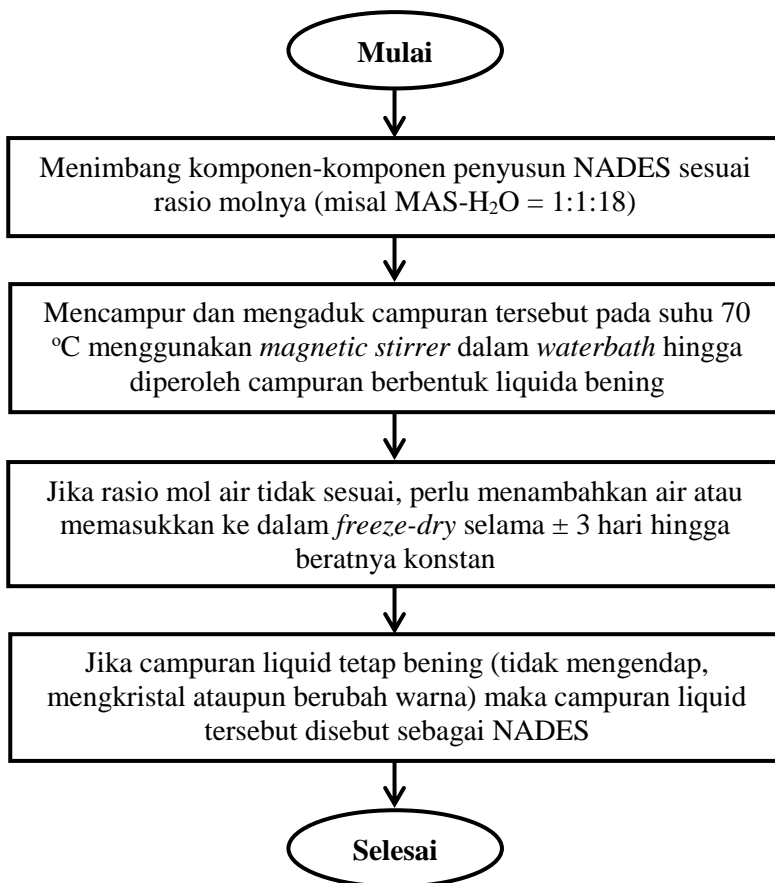
### III.4 Diagram Alir Metode Penelitian

#### III.4.1 Diagram Alir Penelitian Secara Keseluruhan



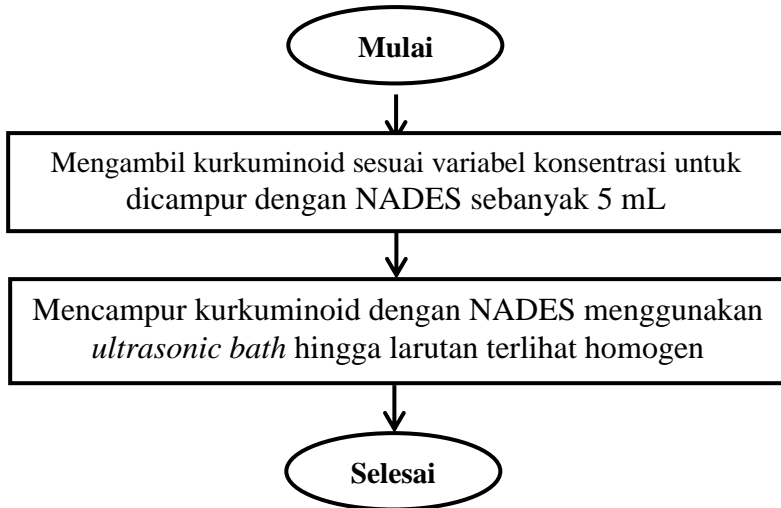
### III.4.2 Diagram Alir Pembuatan Kurkumin Terlarut dalam *Natural Deep Eutectic Solvents* (NADES)

#### III.4.2.1 Diagram Alir Pembuatan *Natural Deep Eutectic Solvents* (NADES)

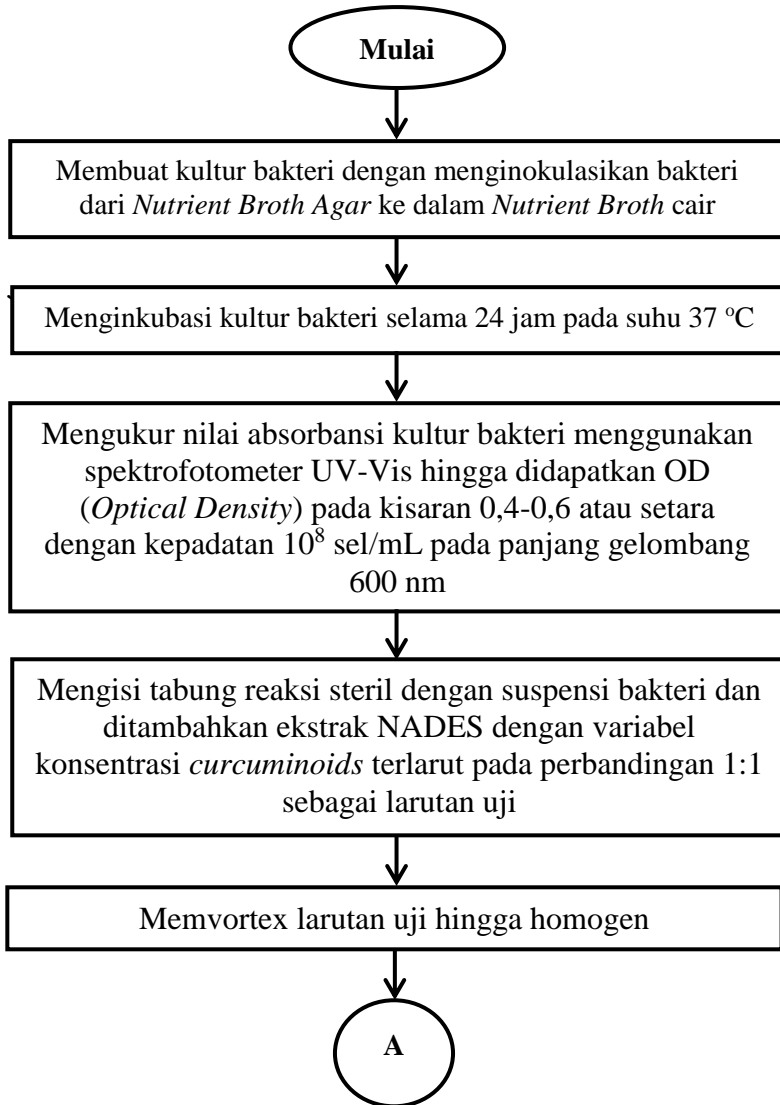


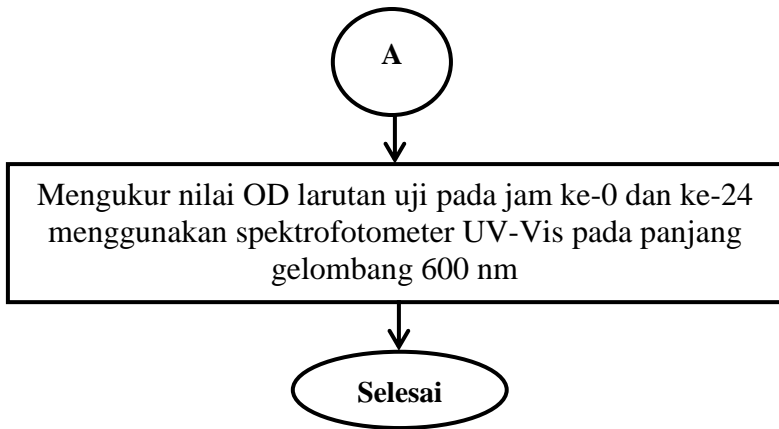


### III.4.2.2 Diagram Alir Pencampuran Kurkuminoid pada *Natural Deep Eutectic Solvents*

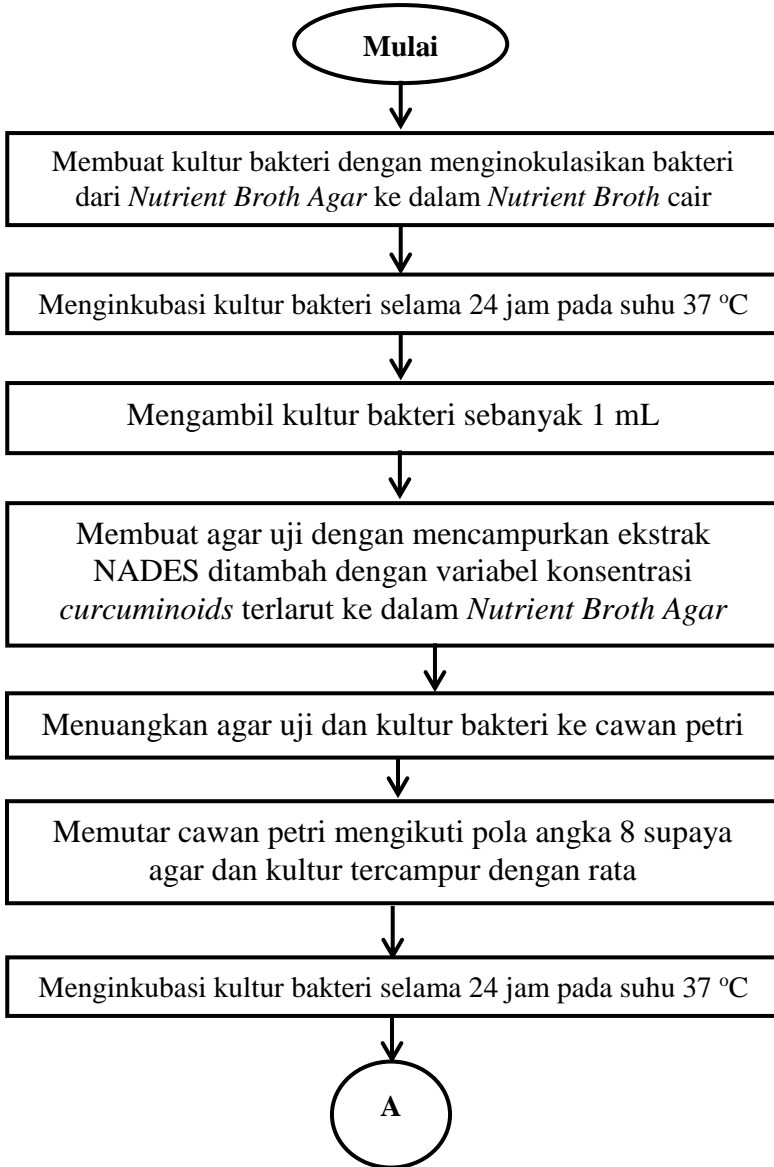


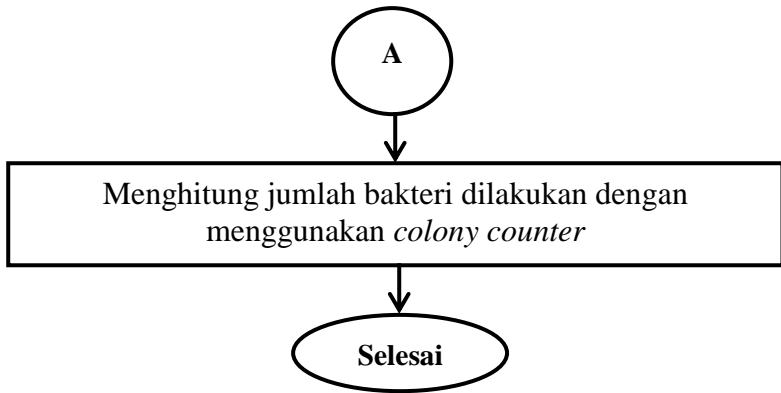
### III.4.3 Diagram Alir Uji *Minimum Inhibitory Concentration*





### III.4.4 Diagram Alir Uji *Minimum Bactericidal Concentration*





*Halaman ini sengaja dikosongkan*

## IV HASIL DAN PEMBAHASAN

### IV.1 *Minimum Inhibitory Concentration (MIC)*

Uji *Minimum Inhibitory Concentration (MIC)* atau aktivitas anti-bakteri ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi minimum kurkuminoid pada variabel (dilakukan pada masing-masing variabel NADES) yang hanya dapat mencegah/menghambat pertumbuhan dari bakteri saja, bukan untuk membunuh bakteri tersebut. Uji ini ditunjukkan dengan tidak adanya kekeruhan pada tabung reaksi setelah melewati proses inkubasi selama 24 jam (Owuama, 2017).

Berikut aktivitas anti-bakteri yang diujikan pada variabel NADES jenis *malic acid*-sukrosa-air (MAS-H<sub>2</sub>O = 1:1:18) dengan penambahan konsentrasi kurkuminoid (0 mM; 2 mM; 2,25 mM; 2,5 mM; 2,75 mM; 3 mM; 3,25 mM; 3,5 mM; 3,75 mM; 4 mM) pada bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* pada kondisi operasi 37 °C dengan metode pengujian secara visual yang disajikan pada Gambar 13 dan Gambar 14



**Gambar 13** Uji MIC pada kurkumin terlarut NADES jenis *malic acid*-sukrosa-air (MAS-H<sub>2</sub>O = 1:1:18) pada berbagai konsentrasi dengan *S.Aureus*



**Gambar 14** Uji MIC pada kurkumin terlarut NADES jenis *malic acid*-sukrosa-air (MAS-H<sub>2</sub>O = 1:1:18) pada berbagai konsentrasi dengan *E. Coli*

Pengujian MIC ini ditunjukkan setelah media tabung diinkubasi selama 1x24 jam, semua larutan uji (dalam tabung reaksi) tersebut dibandingkan kekeruhannya secara visual. Bila kekeruhan masing-masing tabung lebih keruh dari tabung blanko (tabung berisi kurkuminoid terlarut dalam NADES jenis *malic acid*-sukrosa-air (MAS-H<sub>2</sub>O = 1:1:18) tanpa bakteri), berarti bakteri masih dapat bertumbuh. Akan tetapi ketika larutan dalam tabung terlihat mulai jernih, ataupun memiliki kejernihan sama dengan tabung blanko berarti pertumbuhan bakteri mulai terhambat. Kondisi ini, secara kualitatif menunjukkan adanya MIC.

Hasil tabung uji berisi larutan kurkuminoid terlarut dalam NADES jenis *malic acid*-sukrosa-air (MAS-H<sub>2</sub>O = 1:1:18) dengan



konsentrasi (0 mM; 2 mM; 2,25 mM; 2,5 mM; 2,75 mM; 3 mM; 3,25 mM; 3,5 mM; 3,75 mM; 4 mM) tidak menunjukkan adanya kekeruhan. Tabung uji MAS-H<sub>2</sub>O (1:1:18) pada berbagai konsentrasi kurkuminoid tersebut sama jernih dengan tabung blanko. Sehingga disimpulkan bahwa blanko MAS-H<sub>2</sub>O (tanpa adanya kurkuminoid terlarut di dalamnya) telah menunjukkan adanya penghambatan bakteri baik *E. Coli* ataupun *S. Aureus* atau MIC.

Pengujian MIC secara visual sebagaimana tersebut diatas, kualitatif, sudah dapat menentukan konsentrasi sampel yang memberikan MIC; sebagaimana dilakukan pada variable MAS-H<sub>2</sub>O (1:1:18), **Gambar 13** dan **Gambar 14**. Namun metode ini memiliki kekurangan, pengamatan kekeruhan secara visual cenderung menimbulkan ketidakseragaman hasil pengamatan; kepekatan warna larutan juga dapat mempengaruhi pengamatan kekeruhan sehingga hasil pengamatan menjadi kurang akurat. Selain itu tidak dapat dibedakan antara sel bakteri yang hidup dengan sel bakteri yang mati. Oleh karena itu, selanjutnya pengujian lebih lanjut dengan mengukur nilai absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Lolongan, et al., 2016) untuk variabel NADES Fruktosa-Glukosa-air (FG-H<sub>2</sub>O = 1:1:7) dan Fruktosa-Sukrosa-air (FS-H<sub>2</sub>O = 2:1:15) juga dilakukan. Pengujian MIC dengan metode spektrofotometri UV-Vis dilakukan dengan pengukuran absorbansi sebelum dan sesudah proses inkubasi (setelah 24 jam waktu inkubasi pada 37 °C),

Jika nilai absorbansi sebelum diinkubasi lebih tinggi dibandingkan nilai absorbansi sesudah diinkubasi, maka pertumbuhan bakteri terhambat. Sebaliknya jika nilai absorbansi sesudah inkubasi lebih tinggi dibandingkan sebelum diinkubasi maka masih terjadi pertumbuhan bakteri. Inkubasi dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan sebuah biakan yang murni tanpa adanya mikroba lain yang tidak diinginkan ikut tumbuh. Metode spektrofotometer UV-Vis juga masih memiliki kekurangan dalam selektivitas untuk membedakan sampel dengan partikel-partikel lain atau kontaminan yang menyerap cahaya dalam panjang

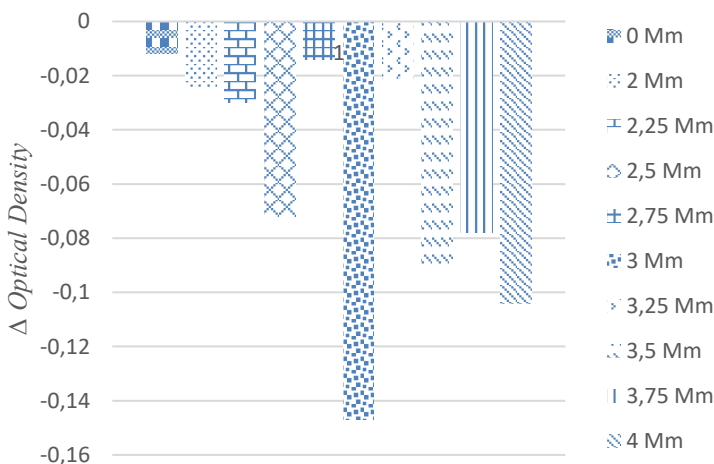
gelombang yang sama. Namun metode spektrofotometer UV-Vis memberikan hasil yang bersifat kuantitatif, sehingga dapat dikatakan hasilnya lebih akurat dibandingkan metode pengamatan kekeruhan (Lolongan, et al., 2016).

Melalui hasil penelitian terdapat perbedaan prinsip kerja metode visual (turbidimetri) dan spektrofotometer UV-Vis. Pada metode turbidimetri peneliti hanya melihat hasil secara visual, dengan melihat kekeruhannya, jadi dapat dikatakan hasilnya cenderung bersifat subjektif. Metode spektrofotometer UV-Vis juga masih memiliki kekurangan dalam selektivitas untuk membedakan sampel dengan partikel-partikel lain atau kontaminan yang menyerap cahaya dalam panjang gelombang yang sama. Kelebihan metode spektrofotometer UV-Vis yaitu hasil yang didapatkan bersifat kuantitatif sehingga dapat dikatakan hasilnya lebih akurat. *High Pressure Liquid Chromatography* (HPLC) merupakan salah satu metode kimia dan fisikokimia. HPLC termasuk metode analisis terbaru yaitu suatu teknik kromatografi dengan fasa gerak cairan dan fasa diam cairan atau padat. Metode ini mempunyai banyak kelebihan jika dibandingkan dengan metode lainnya. Pada metode HPLC memiliki hasil yang lebih baik dari pada metode spektrofotometri dari segi keakuratan, ketelitian, dan sensitivitas dalam membaca nilai absorbansi (Lolongan, et al., 2016).

Sampel uji NADES jenis Fruktosa-Glukosa-air (FG-H<sub>2</sub>O = 1:1:7) dan Fruktosa-Sukrosa-air (FS-H<sub>2</sub>O = 2:1:15) dengan berbagai konsentrasi kurkuminoid (0 mM; 2 mM; 2,25 mM; 2,5 mM; 2,75 mM; 3 mM; 3,25 mM; 3,5 mM; 3,75 mM; 4 mM) pada kondisi operasi 37 °C diuji secara spektrofotometer UV-Vis (**Gambar 15**, **Gambar 16**, **Gambar 17**, dan **Gambar 18**).

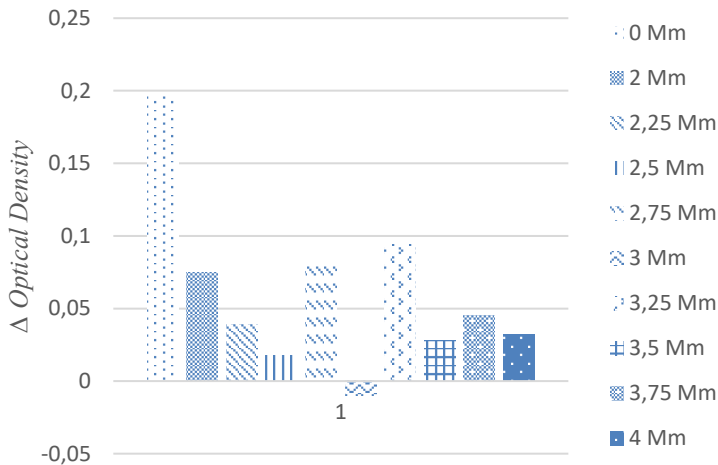
Pengukuran absorbansi pada sampel uji larutan NADES jenis fruktosa-glukosa-air (FG-H<sub>2</sub>O = 1:1:7) dengan berbagai konsentrasi kurkuminoid terlarut pada bakteri *E. Coli* (**Gambar 15**) menunjukkan penurunan nilai absorbansi sebelum dan sesudah inkubasi; adanya penghambatan pertumbuhan bakteri setelah inkubasi 24 jam. Namun trend yang berlawanan teramati pada sampel

dengan bakteri *S. Aureus* (**Gambar 16**). Penambahan larutan NADES jenis fruktosa-glukosa-air (FG-H<sub>2</sub>O = 1:1:7) dengan berbagai konsentrasi kurkuminoid terlarut menaikkan nilai absorbansi sebelum dan sesudah inkubasi, kurkuminoid terlarut dalam NADES FG-H<sub>2</sub>O (1:1:7) tidak menghambat pertumbuhan bakteri. Hal ini disebabkan *S. Aureus* memiliki resisten yang cukup baik terhadap beberapa antimikroba seperti kurkuminoid (Wasitaningrum, 2009). Hanya pada konsentrasi 3 mM saja yang mengalami penurunan (**Gambar 16**). Mempertimbangkan, nilai OD pada konsentrasi 3,25-4,00 mM pada *S. Aureus* kembali meningkat, maka dimungkinkan hasil pada 3 mM tidaklah valid. Selain itu, konsentrasi kurkumin terlarut sebesar 3 mM pada FG-H<sub>2</sub>O (1:1:7) dijadikan dasar uji pada penentuan *Minimum*



*Bactericidal Concentration* (MBC) (**subbab IV.2**).

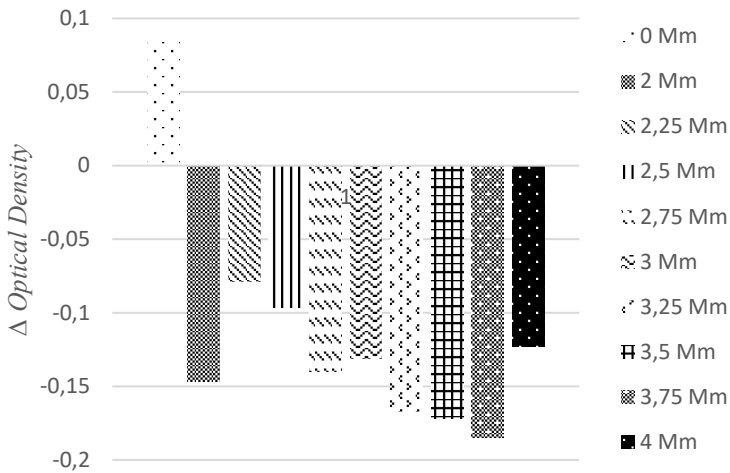
**Gambar 15** *Optical Density* pada kurkumin dengan berbagai konsentrasi terlarut dalam NADES jenis Fruktosa-Glukosa-air (FG-H<sub>2</sub>O = 1:1:7) pada *E.Coli*



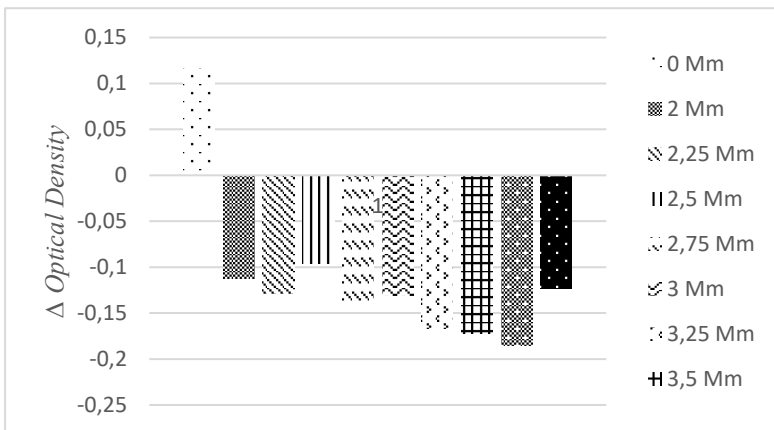
**Gambar 16** *Optical Density* pada kurkumin dengan berbagai konsentrasi terlarut dalam NADES jenis Fruktosa-Glukosa-air (FG-H<sub>2</sub>O = 1:1:7) pada *S.Aureus*

Hasil (**Gambar 15**) menunjukkan, konsentrasi kurkumin 0-4,00 mM pada NADES FG-H<sub>2</sub>O (1:1:7) memberikan penghambatan pada bakteri *E.Coli* selama 1x24 jam, sedangkan pada *S. Aureus* (**Gambar 16**) tidak memberikan penghambatan sama sekali. Sehingga disimpulkan, konsentrasi kurkumin terendah, 2 mM, terlarut dalam NADES FG-H<sub>2</sub>O (1:1:7) merupakan MIC untuk *E.Coli*. Sedangkan pada konsentrasi kurkumin yang di pelajari, 2,00-4,00 mM, belum ditemukan nilai MIC untuk *S. Aureus*.

Selanjutnya untuk pengukuran absorbansi pada sampel uji larutan NADES jenis fruktosa-sukrosa-air (FS-H<sub>2</sub>O = 2:1:15) dengan berbagai konsentrasi kurkumin terlarut pada bakteri *E. Coli* dan *S. Aureus* menunjukkan penurunan nilai absorbansi sebelum dan sesudah inkubasi, hanya pada blanko saja yang mengalami kenaikan nilai absorbansi (**Gambar 17** dan **Gambar 18**).



**Gambar 17** *Optical Density* pada kurkumin dengan berbagai konsentrasi terlarut dalam NADES jenis Fruktosa-Sukrosa-air (FS-H<sub>2</sub>O = 2:1:15) pada *E.Coli*



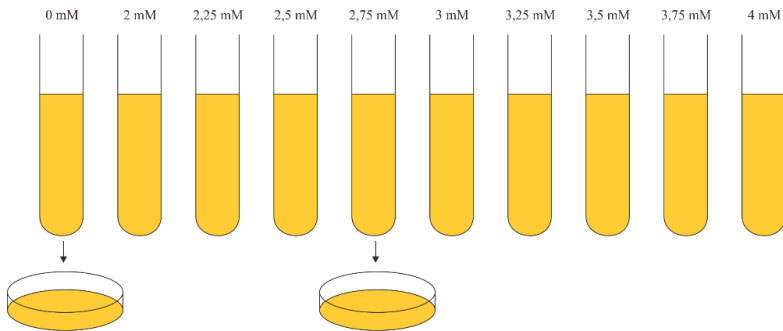
**Gambar 18** *Optical Density* pada kurkumin dengan berbagai konsentrasi terlarut dalam NADES jenis Fruktosa-Sukrosa-air (FS-H<sub>2</sub>O = 2:1:15) pada *S.Aureus*

Sebagaimana hasil pada FG-H<sub>2</sub>O (1:1:7), konsentrasi kurkumin terlarut 2,00-4,00 mM pada NADES FS-H<sub>2</sub>O (2:1:15) memberikan penghambatan baik pada bakteri *E.Coli* ataupun *S. Aureus* selama 1x24 jam. Sehingga disimpulkan, konsentrasi kurkumin terendah, 2 mM, terlarut dalam NADES FS-H<sub>2</sub>O (2:1:15) merupakan MIC untuk *E.Coli* ataupun *S. Aureus*.

#### **IV.2 Minimum Bactericidal Concentration (MBC)**

Uji *Minimum Bactericidal Concentration (MBC)* aktivitas anti-bakteri ini bertujuan untuk mengetahui jenis variabel yang dapat memberikan dampak pembasmian bakteri terbaik, membasmi >99,99% dari inokulum bakteri awal dengan ditunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri yang terlihat di *plate* agar (Bhatt & Mondal, 2015).

Aktivitas anti-bakteri diujikan pada variabel jenis NADES (MAS-H<sub>2</sub>O = 1:1:18; FG-H<sub>2</sub>O = 1:1:7; FS-H<sub>2</sub>O = 2:1:15) dan konsentrasi kurkuminoid (0 mM; 2 mM; 2,25 mM; 2,5 mM; 2,75 mM; 3 mM; 3,25 mM; 3,5 mM; 3,75 mM; 4 mM) melawan *S. aureus* dan *E. coli* pada kondisi operasi 37 °C disajikan **Gambar 19**. Mengingat uji MBC ini merupakan tahap lanjut dari uji MIC (**subbab IV.1**), maka konsentrasi kurkumin terlarut di dalam NADES untuk setiap variable NADES yang dipelajari disesuaikan dengan hasil dari uji MIC.

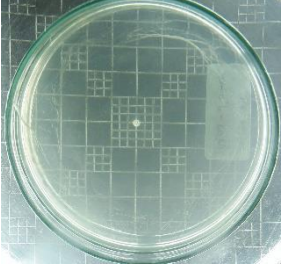
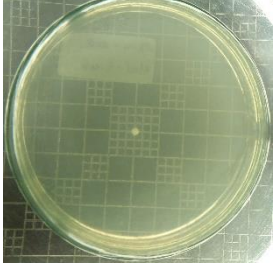

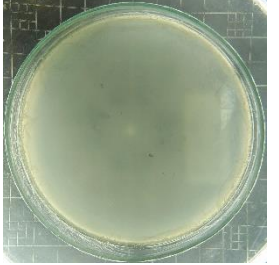

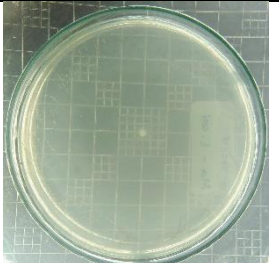


**Gambar 19** Metode Uji MBC (Yilmaz, 2012)

Uji MBC yang dilakukan memberikan hasil berupa jumlah bakteri dalam CFU/mL pada berbagai jenis NADES yang dipelajari ditampilkan pada **Tabel 4**, **Tabel 5** dan **Tabel 6**. Uji MBC ini dilakukan secara *total plate count* (TPC) menggunakan *colony counter*. *Plate* dengan koloni lebih dari 250 koloni tidak dapat dihitung dan dianggap sebagai *too numerous to count* (TNTC). *Plate* dengan koloni kurang dari 25 koloni dianggap sebagai *too few to count* (TFTC).

Sebagaimana hasil uji MIC pada NADES MAS-H<sub>2</sub>O (1:1:18) bahwa MAS-H<sub>2</sub>O (1:1:18) blanko (tanpa kurkumin terlarut didalam NADES) menunjukkan adanya penghambatan bakteri baik pada *E. coli* ataupun *S. aureus* (**Gambar 13** dan **Gambar 14**). Oleh sebab itu, uji MBC untuk NADES MAS-H<sub>2</sub>O (1:1:18) ini digunakan larutan uji NADES MAS-H<sub>2</sub>O (1:1:18) (blanko, tanpa kurkumin terlarut), MA-H<sub>2</sub>O (1:18) dan S-H<sub>2</sub>O (1:18) (**Tabel 4**).

**Tabel 4** *Minimum Bactericidal Concentration* pada MAS-H<sub>2</sub>O (1:1:18)

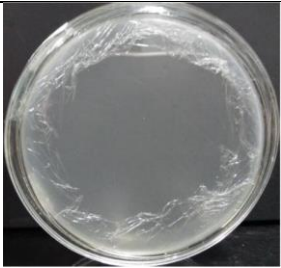
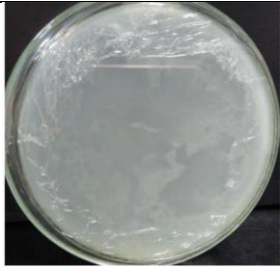
No.	Nama Sampel	Hasil Uji	
		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Eschericia coli</i>
1	MAS-H <sub>2</sub> O (1:1:18)	 Negatif, tidak ada pertumbuhan bakteri	 Negatif, tidak ada pertumbuhan bakteri
2	S-H <sub>2</sub> O (1:18)	 Positif, bakteri tumbuh dengan jumlah yang terlalu banyak (TNTC)	 Positif, bakteri tumbuh dengan jumlah yang terlalu banyak (TNTC)
3	MA-H <sub>2</sub> O (1:18)	 Negatif, tidak ada pertumbuhan bakteri	 Negatif, tidak ada pertumbuhan bakteri

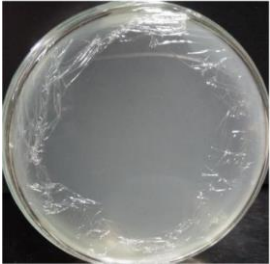
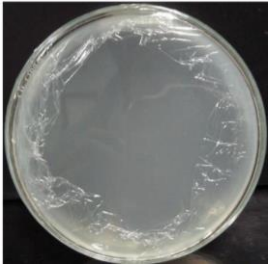
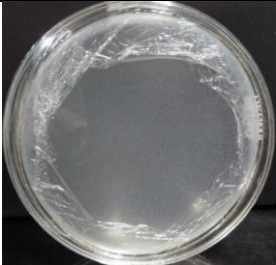
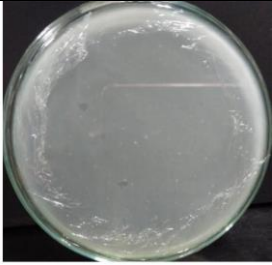


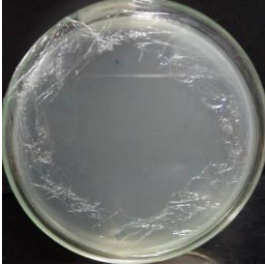
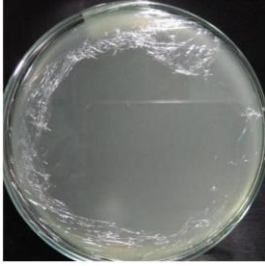
		Negatif, tidak ada pertumbuhan bakteri	Negatif, tidak ada pertumbuhan bakteri
--	--	--	--

Sedangkan untuk NADES FG-H<sub>2</sub>O (1:1:7) dan FS-H<sub>2</sub>O (2:1:15), uji MBC dilakukan dengan mempertimbangkan hasil uji MIC. Untuk uji MBC diambil 3 macam variabel konsentrasi dari MIC: 1. Blanko; 2. Konsentrasi kurkumin yg punya selisih nilai OD terbesar; dan 3. Konsentrasi kurkumin yg punya selisih nilai OD terkecil. Pada NADES FG-H<sub>2</sub>O (1:1:7), konsentrasi kurkumin terlarut 3 mM dilakukan uji MBC (**Tabel 5**). Uji MBC untuk NADES FS-H<sub>2</sub>O (2:1:15) dilakukan pada konsentrasi kurkumin terlarut yang berbeda untuk setiap variabel bakteri. Konsentrasi kurkumin terlarut 2,25 mM dan 3 mM dilakukan uji MBC pada *Staphylococcus aureus*, sedangkan konsentrasi kurkumin terlarut 2,5 mM dan 3,75 mM dilakukan uji MBC pada *Eschericia coli* (**Tabel 6**).

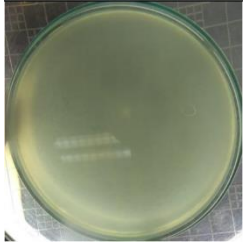
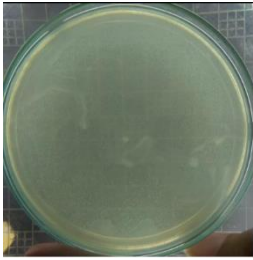
**Tabel 5** *Minimum Bactericidal Concentration* pada FG-H<sub>2</sub>O (1:1:7)

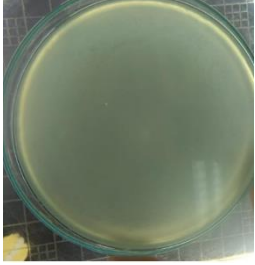
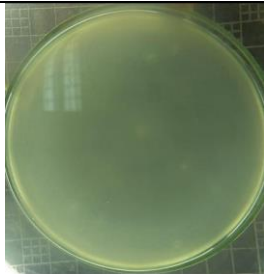
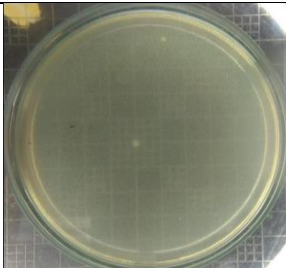
No.	Nama Sampel	Hasil Uji	
		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Eschericia coli</i>
1	FG-H <sub>2</sub> O (1:1:7)		

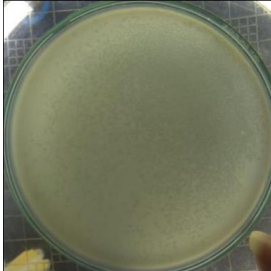
		Positif, bakteri tumbuh dengan jumlah yang terlalu banyak (TNTC)	Positif, bakteri tumbuh dengan jumlah yang terlalu banyak (TNTC)
2	F-H <sub>2</sub> O (1:7)	 <p>Positif, bakteri tumbuh dengan jumlah yang terlalu banyak (TNTC)</p>	 <p>Positif, bakteri tumbuh dengan jumlah yang terlalu banyak (TNTC)</p>
3	G-H <sub>2</sub> O (1:7)	 <p>Positif, bakteri tumbuh dengan jumlah sebanyak = <math>4,27 \times 10^2</math> CFU/mL (TNTC)</p>	 <p>Positif, bakteri tumbuh dengan jumlah sebanyak = <math>5,04 \times 10^2</math> CFU/mL (TNTC)</p>

4	3 mM kurkuminoid dalam FG-H <sub>2</sub> O (1:1:7)	 <p data-bbox="405 469 669 625">Positif, bakteri tumbuh dengan jumlah yang terlalu banyak (TNTC)</p>	 <p data-bbox="706 469 971 625">Positif, bakteri tumbuh dengan jumlah yang terlalu banyak (TNTC)</p>
---	--	---	---

**Tabel 6** *Minimum Bactericidal Concentration* pada FS-H<sub>2</sub>O (2:1:15)

No .	Nama Sampel	Hasil Uji	
		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Eschericia coli</i>
1	FS-H <sub>2</sub> O (2:1:15)	 <p data-bbox="405 1193 647 1350">Positif, bakteri tumbuh dengan jumlah yang terlalu banyak (TNTC)</p>	 <p data-bbox="692 1193 945 1350">Positif, bakteri tumbuh dengan jumlah yang terlalu banyak (TNTC)</p>

2	2,25 mM kurkuminoi d dalam FS-H <sub>2</sub> O (2:1:15)	 <p>Positif, bakteri tumbuh dengan jumlah yang terlalu banyak (TNTC)</p>	-
3	2,5 mM kurkuminoi d dalam FS-H <sub>2</sub> O (2:1:15)	-	 <p>Positif, bakteri tumbuh dengan jumlah yang terlalu banyak (TNTC)</p>
4	3,5 mM kurkuminoi d dalam FS-H <sub>2</sub> O (2:1:15)		-

		Positif, bakteri tumbuh dengan jumlah yang terlalu banyak (TNTC)	
5	3,75 mM kurkuminoi d dalam FS-H <sub>2</sub> O (2:1:15)	-	 <p>Positif, bakteri tumbuh dengan jumlah yang terlalu banyak (TNTC)</p>

Hasil uji MBC pada NADES MAS-H<sub>2</sub>O (1:1:18) (**Tabel 4**), menunjukkan tidak terdapat pertumbuhan bakteri blanko MAS-H<sub>2</sub>O (1:1:18); dan blanko MA-H<sub>2</sub>O (1:18); hanya blanko S-H<sub>2</sub>O (1:18) yang terdapat pertumbuhan bakteri.

Hasil uji MBC pada variabel kurkuminoid terlarut pada jenis NADES FG-H<sub>2</sub>O (1:1:7) terlihat pada **Tabel 5**, didapatkan bahwa variabel konsentrasi kurkuminoid 3 mM dalam FG-H<sub>2</sub>O (1:1:7); blanko FG-H<sub>2</sub>O (1:1:7); blanko F-H<sub>2</sub>O (1:7); dan blanko G-H<sub>2</sub>O (1:7) terdapat pertumbuhan bakteri. Pada blanko G-H<sub>2</sub>O (1:7) terdapat jumlah bakteri *S. aureus* sebanyak  $4,27 \times 10^2$  CFU/mL dan *E. coli* sebanyak  $5,04 \times 10^2$  CFU/mL.

Sedangkan hasil uji MBC pada variabel kurkuminoid terlarut pada jenis NADES FS-H<sub>2</sub>O (2:1:15) yang terdapat pada **Tabel 6**, didapatkan bahwa variabel konsentrasi kurkuminoid 2,25 mM; 2,5 mM; 3,5 mM dan 3,75 mM dalam FS-H<sub>2</sub>O (2:1:15); serta

pada blanko FS-H<sub>2</sub>O (2:1:15) terdapat pertumbuhan bakteri dengan jumlah yang terlalu banyak (TNTC).

Sehingga secara keseluruhan dapat dikatakan bahwa NADES MAS-H<sub>2</sub>O (1:1:18) efektif membasmi pertumbuhan bakteri hingga >99,99% baik terhadap *E. coli* ataupun *S. aureus*. Sedangkan pada blanko G-H<sub>2</sub>O (1:7) masih terdapat  $4,27 \times 10^2$  CFU/mL bakteri *S. aureus* yang tumbuh dan  $5,04 \times 10^2$  CFU/mL untuk *E. coli* (dari  $1,3 \times 10^8$  CFU/mL bakteri yang ditambahkan). NADES FS-H<sub>2</sub>O (2:1:15) tidak menunjukkan adanya MBC pada berbagai konsentrasi kurkuminoid yang dipelajari, 2,00-4,00 mM.

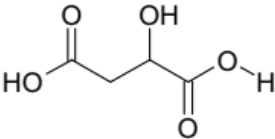
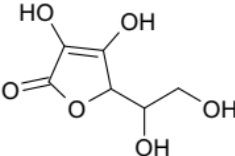
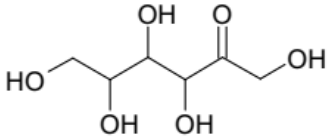
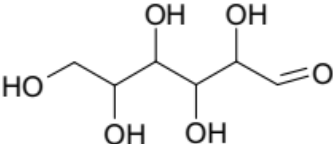
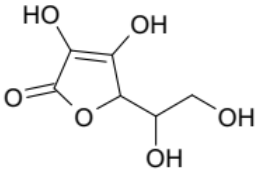
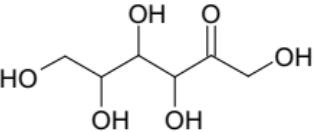
Dari uji MBC yang dilakukan dengan metode *colony counting* menggunakan *colony counter*, menurut Todar (2012), memiliki batasan yaitu tidak dapat membedakan antara bakteri hidup dan mati. Sehingga, untuk analisa lebih lanjut, diperlukan metode menggunakan perhitungan *counting chamber* untuk mendapatkan hasil uji MBC yang lebih akurat.

### **IV.3 Analisis Efek Anti-Mikroba pada NADES**

NADES adalah suatu campuran berbentuk liquid yang merupakan campuran dari senyawa-senyawa metabolit primer seperti gula, gula alkohol, poli-alkohol, basa organik, asam organik, dan asam amino (Choi, et al., 2011). NADES memiliki beberapa keunggulan dibandingkan pelarut lainnya, yaitu biaya rendah, biodegradabilitas, non-toksitas, keberlanjutan, dan metode persiapan sederhana. Selain itu, NADES memiliki sifat fisikokimia yang sangat baik sebagai pelarut: volatilitas dapat diabaikan, keadaan cair bahkan jauh di bawah 0 °C, viskositas yang dapat disesuaikan, rentang polaritas yang luas, dan kekuatan solubilisasi yang tinggi untuk berbagai macam senyawa. (Dai et al., 2013b, Francisco et al., 2013). Berdasarkan beberapa kelebihan NADES tersebut, dalam penelitian ini kami menggunakan NADES untuk sebagai pelarut kurkumin. Berdasarkan senyawa-senyawa penyusunnya, NADES yang digunakan termasuk dalam kelompok sebagai berikut (Dai, et al., 2013) : (1) NADES asam, tersusun dari asam-asam organik: *malic acid*; dan (2) NADES yang netral,

tersusun dari senyawa-senyawa netral: glukosa, fruktosa, dan sukrosa.

**Tabel 7** *Hydrogen Bond Donor (HBD) dan Hydrogen Bond Acceptor (HBA) pada NADES*

Tipe NADES	HBD	HBA
MAS-H <sub>2</sub> O	 <p><i>Malic acid</i> (dapat pula sebagai HBA)</p>	 <p>Sukrosa (dapat pula sebagai HBD)</p>
FG-H <sub>2</sub> O	 <p>Fruktosa (dapat pula sebagai HBA)</p>	 <p>Glukosa (dapat pula sebagai HBD)</p>
FS-H <sub>2</sub> O	 <p>Sukrosa (dapat pula sebagai HBA)</p>	 <p>Fruktosa (dapat pula sebagai HBD)</p>

Hasil penelitian menunjukkan bahwa NADES (MAS-H<sub>2</sub>O) memiliki aktivitas anti-mikroba paling efektif dibandingkan dengan tipe netral (FG-H<sub>2</sub>O dan FS-H<sub>2</sub>O). Publikasi sebelumnya dari Radosevic & Canak (2017) juga mengindikasikan bahwa NADES dengan penyusun asam organik memiliki aktivitas anti-

mikroba lebih tinggi daripada NADES mengandung alkohol, amino dan gula. Pengaruh dari sebuah gugus hidroksil tambahan untuk asam organik sebagai HBD meningkatkan aktivitas anti-bakteri (Zhao & Xu, 2015). Perbandingan *Hydrogen Bond Donor (HBD)* dan *Hydrogen Bond Acceptor (HBA)* pada NADES digunakan dalam penelitian ini ditampilkan pada **Tabel 7**. Pada dasarnya setiap komponen NADES memiliki HBD dan HBA yang berpotensi untuk menjadi sebaliknya.

Toksitas NADES terhadap suatu mikroorganisme juga dapat dipengaruhi oleh pH NADES itu sendiri. NADES mengandung asam malat adalah asam kuat ( $\text{pH} < 3$ ), sementara NADES mengandung gula termasuk asam lemah ( $\text{pH} > 5$ ). Uji mikroba pada NADES mengandung asam malat menunjukkan efektivitas tinggi dalam membasmi bakteri *S. aureus* dan *E. coli*. Beberapa laporan menunjukkan bahwa NADES meningkatkan permeabilitas membran lipid pada sel-sel eukariotik (Mbous & Hayyan, 2017). Akan tetapi faktor yang mempengaruhi membran bakteri masih belum diketahui, walaupun solubilitas komponen pada membran bakteri; osmolalitas; atau *chelation* ikatan membran (Wikene & Hakon, 2017) juga dapat mempengaruhi.

Pengaruh NADES terhadap bakteri dimungkinkan sbb: (1) adanya efek antibakteri pada NADES dikarenakan rendahnya pH NADES,  $\text{pH} < 3$ . Kondisi lingkungan yang asam ( $\text{pH} < 3$ ) tidak kondusif terhadap pertumbuhan bakteri, melemahkan bakteri dan akhirnya membuat pertumbuhan mereka rentan terhadap faktor-faktor lain. Hal ini, terlihat pada penggunaan MAS-H<sub>2</sub>O (1:1:18): blanko larutan MAS-H<sub>2</sub>O (1:1:18) menunjukkan terhambatnya pertumbuhan bakteri dan pembasmian bakteri hingga  $>99,99\%$  melalui uji MIC (**subbab IV.1**) dan MBC (**subbab IV.2**) yang telah dilakukan; (2) adanya peptidoglikan, sebuah rantai panjang polisakarida yang terdiri dari asam N-acetylmuramic dan residu N-acetylglucosamine yang *cross-linked* oleh peptida-peptida pendek (Radosevic & Canak, 2017); dan (3) NADES mungkin sebagian terpisahkan dalam larutan dan kation pada NADES dapat berinteraksi dengan rantai polisakarida melalui ikatan hidrogen



atau interaksi elektrostatis yang menyebabkan gangguan dinding sel (Wen & Chen, 2015). Namun, kami belum bisa menghubungkan faktor ke-2 dan ke-3 tsb dalam penelitian kami.

Pada penelitian milik Wikene, et al. (2015), jumlah bakteri yang hidup sedikit, dan secara signifikan berkurang, setelah kontak dengan NADES. Ini dibuktikan dengan perbedaan absorbansi *tetrakis(4-hydroxyphenyl)-porphyrin* (THPP) dalam NADES atau asam sitrat terjadi penurunan secara drastis sebesar 91% selama 168 jam, sedangkan absorbansi *tetrakis(4-hydroxyphenyl)-porphyrin* (THPP) dalam air terjadi hanya sebesar 6% selama 168 jam. Pengurangan ini mungkin karena efek asam (pH ~ 3) yang dikombinasikan dengan efek 'NADES' (NADES yang digunakan adalah asam sitrat). NADES dapat melemahkan bakteri dengan mengekstraksi komponen yang larut dalam air dan tidak larut dari membran bakteri (NADES melarutkan beberapa molekul kecil dan makromolekul, antara lain DNA (Dai, et al., 2013)). Gangguan dinding sel bakteri dikarenakan adanya muatan yang terdelokalisasi dalam NADES. Hayyan et al. dan Wen et al. melaporkan bahwa toksisitas DES pada bakteri *Escherichia coli* lebih tinggi daripada komponen masing-masing DES; efek ini dianggap berasal dari delokalisasi muatan melalui ikatan hidrogen antara anion dan HBD (Wen & Chen, 2015; Hayyan, et al., 2013). Adanya gangguan interaksi muatan pada bakteri hingga menyebabkan lisis dikarenakan NADES yang memiliki sifat asam (pH rendah). Berikut adalah perbandingan hasil penelitian-penelitian sebelumnya tentang pengaruh NADES dan kurkuminoid terhadap bakteri.

**Tabel 8** Perbandingan Hasil Penelitian-Penelitian Sebelumnya

Nama Peneliti (Tahun)	Tentang Penelitian	Hasil
Wikene (2015)	<p>Judul: Improved antibacterial phototoxicity of a neutral porphyrin in natural deep eutectic solvents</p> <p>Jenis NADES: Asam sitrat-sukrosa (1:1)</p> <p>Glukosa-asam malat (1:1)</p> <p>Senyawa terlarut: THPP</p> <p>Metode penelitian: Bakteri <i>Enterococcus faecalis</i> dan <i>Escherichia coli</i> disuspensikan dari gliserol dan diinkubasi selama 24</p>	<p>Jumlah bakteri yang hidup sedikit, dan secara signifikan berkurang, setelah kontak dengan NADES. Ini dibuktikan dengan perbedaan absorbansi <i>tetrakis(4-hydroxyphenyl)-porphyrin</i> (THPP) dalam NADES atau asam sitrat terjadi penurunan secara drastis sebesar 91% selama 168 jam, sedangkan absorbansi <i>tetrakis(4-hydroxyphenyl)-porphyrin</i> (THPP) dalam air terjadi hanya sebesar 6% selama 168 jam. Pengurangan ini mungkin karena efek asam (pH ~ 3) yang dikombinasikan dengan efek</p>

	<p>jam. <i>Citric acid-Sucrose</i> (CS) dan <i>Malic acid-Glucose</i> (MG). Iradiasi dilakukan menggunakan cahaya biru pada panjang gelombang 400-500 nm. Setelah inkubasi akhir diplatekan pada agar menggunakan <i>automatic spiral plater</i>. Data statistik dilakukan ANOVA menggunakan metode Fischer.</p>	<p>'NADES' (NADES yang digunakan adalah asam sitrat).</p>
<p>Wen (2015)</p>	<p>Judul: Assessing the toxicity and biodegradability of deep eutectic solvents          Jenis NADES: Choline chloride-DES (1:1); dan</p>	<p>DES pada tingkat konsentrasi rendah (&lt;75 mM), dampak pada pertumbuhan bakteri tidak tinggi, dengan indeks penghambatan lebih rendah dari 10%. Sementara selama peningkatan konsentrasi</p>

	<p>Choline acetate-DES (1:1)</p> <p>Metode penelitian: Inokulasi <i>E. coli</i> pada DES menggunakan <i>Mueller-Hinton broth</i>. Pertumbuhan bakteri diukur secara absorbansi pada 550 nm.</p>	<p>DES, indeks penghambatan 72,8-93,8% didapatkan dari DES pada konsentrasi 0,75 M.</p>
<p>Wikene (2017)</p>	<p>Judul: Investigation of the antimicrobial effect of natural deep eutectic solvents (NADES) as solvents in antimicrobial photodynamic therapy</p> <p>Jenis NADES: Asam sitrat-sukrosa (1:100); dan Asam malat-fruktosa-glukosa (1:100)</p>	<p>NADES mengurangi jumlah bakteri pada <i>E. coli</i> masing-masing sebesar 96% dan 24%.</p>

	<p>Senyawa terlarut:  <b>THPP</b></p> <p>Metode penelitian:  Mikroorganisme dalam PBS dicampur dengan <i>citric acid-sucrose</i> dan <i>malic acid-fructose-glucose</i> dalam <i>96 well plate</i>.  Iradiasi dilakukan pada panjang gelombang 400-550 nm. Unit pembentukan koloni (CFU)/mL dihitung selama inkubasi 16-20 jam.</p>	
--	---	--

Mengingat bakteri gram negatif (dalam penelitian ini diwakili oleh *E.Coli*) memiliki membran luar lipopolisakarida ekstra pada dinding selnya, maka *E.Coli* tidak rentan terhadap gangguan penambahan NADES. Wen & Chen (2015) menunjukkan bahwa NADES asam, *Choline Chloride (ChCl)/malic acid*; *ChCl/malic acid*; dan *ChCl/malonic acid*, menyebabkan terjadinya lisis pada bakteri gram positif lebih besar daripada bakteri gram negatif. Sedangkan pada penelitian kami, fenomena tersebut dapat dibuktikan pada variabel G-H<sub>2</sub>O. Hal ini dapat

menjadi alasan mengapa pada uji blanko G-H<sub>2</sub>O di **Tabel 5**, bakteri *E. coli* berjumlah lebih banyak dari *S. aureus*.

NADES yang tersusun atas gula-gula seperti fruktosa, sukrosa dan glukosa seperti FG-H<sub>2</sub>O dan FS-H<sub>2</sub>O, terlihat tidak memiliki adanya aktivitas anti-mikroba. Terlihat dengan tumbuhnya bakteri dalam jumlah sangat banyak *too numerous too count* (TNTC) (**Tabel 5** dan **6**). Karbohidrat (terutama glukosa dan fruktosa) merupakan sumber karbon dan sumber energi untuk pertumbuhan sel bakteri. Glukosa, terutama, dimetabolisme melalui jalur glikolisis; menyediakan energi dan intermediet metabolik untuk asam trikarboksilat. Glukosa juga menyediakan ribosom dengan *pentose phosphate*, yang dibutuhkan untuk sintesis asam nukleat (Butler, 2004). NADES mengandung gula mempunyai pengaruh pada peran metabolisme sel bakteri sejalan dengan hasil penelitian kami.

Menurut Prescott (2002), karena bakteri terpisahkan dari lingkungannya oleh membran plasma selektif, mereka dapat dipengaruhi oleh perubahan tekanan osmotik atau ketersediaan air di sekitarnya. Tekanan osmotik adalah gaya yang terjadi ketika dua larutan dari konsentrasi zat terlarut yang berbeda dipisahkan oleh membran yang hanya dapat diresap ke pelarut. Pada penelitian Purnama (2013), uji aktivitas antibakteri menggunakan metode dilusi terlihat bahwa pada konsentrasi glukosa 100% hingga 50% sel mengalami dehidrasi dan terjadi kematian sel. Penelitian tersebut juga mengungkapkan bahwa sel-sel bakteri *E. coli* dan *Pseudomonas* spp ketika disuspensikan dalam larutan hipertonis maka terjadi pelepasan membran plasma dari dinding sel bakteri (plasmolisis) secara cepat, hal ini disebabkan karena terjadinya kehilangan air. Namun, perlu adanya penelitian lebih lanjut apakah satu macam komponen gula dan dua macam komponen gula yaitu NADES memiliki mekanisme penghambatan pertumbuhan bakteri yang sama.

Hasil penelitian ini menunjukkan adanya peranan NADES sebagai pelarut kurkuminoid dalam menghambat adanya aktivitas

pertumbuhan bakteri khususnya NADES yang mengandung senyawa asam organik seperti MAS-H<sub>2</sub>O (1:1:18).

#### **IV.4 Analisis Efek Anti-Mikroba pada Kurkuminoid Terlarut**

Kurkuminoid merupakan golongan senyawa berwarna kuning yang terdapat pada tanaman marga *Curcuma*. Kurkuminoid terdiri atas komponen senyawa kurkuminoid (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub>), desmetoksikurkumin (C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>O<sub>5</sub>), dan bisdesmetoksikurkumin (C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>O<sub>4</sub>) yang bobot molekul masing-masing, berturut-turut sebesar, 368, 308, dan 338 g/mol (Setiawan, 2010).

Kurkuminoid yang terkandung di dalam kunyit (*Curcuma domestica valetan*) merupakan bahan aktif yang dapat berperan sebagai antibakteri. Kurkuminoid mempunyai aktivitas menghambat proses proliferasi sel bakteri dan diduga sebagai target penting dari antibiotik. Kurkuminoid yang merupakan senyawa *polyphenolic* ini mampu mempengaruhi fungsi membran sel bakteri yang berperan sebagai barier terhadap enzim otolitik, dengan memodifikasi lipid bilayer membran sel bakteri. Kurkumin dan *protocatechuic acid* yang merupakan senyawa *polyphenolic* berkerjasama dengan mekanisme kerja antimikroba, yaitu melalui penghambatan fungsi membran sel bakteri dan penghambatan sintesis protein pada sel bakteri. Senyawa *polyphenolic* ini memiliki aktivitas antibakteri dan memiliki daya hambat yang baik dalam konsentrasi yang kecil (Prima & Handajani, 2013).

Kurkumin bersifat hidrofobik dengan kelarutan rendah dalam air, stabilitas kimia yang buruk dan bioavailabilitas oral rendah (Heger, et al., 2014). Rendahnya kelarutan kurkumin dalam air (pH = 7,3) hanya sebesar 4 ppb (4 µg/L) turut pula menjadi faktor penghambat. Akibatnya kurkumin sulit untuk berinteraksi dengan jaringan tubuh karena darah mengandung 90% air (Patra & Sleem, 2013) Sehingga membatasi pemanfaatan kurkumin dalam biomedis terutama bila sistem yang digunakan mengandung air. Kurkumin tidak mudah larut dalam air, sedangkan larut dalam pelarut organik, seperti dimetil sulfoksida, etanol, metanol atau aseton, dan memiliki titik lebur 183 °C (Perrone, et al., 2015).

Sedangkan pada NADES kurkuminoid memiliki stabilitas yang lebih baik. Kestabilan kurkuminoid ini diduga berhubungan erat dengan kondisi pH NADES. Kurkuminoid sangat tidak stabil pada Pada pH > 7, sedangkan untuk mendapatkan stabilitas optimal dari kurkuminoid, pH harus dijaga pH<7 (Tonnesen & Karlsen, 1985). Pada kondisi asam (pH< 7), degradasi kurkuminoid berjalan jauh lebih lambat, kurang dari 20% dari total kurkuminoid terdekomposisi pada 1 jam (Kumavat, et al., 2013). Kestabilan kurkuminoid juga dikarenakan adanya gugus hidroksil atau karboksil pada *malic acid*. Kehadiran gugus gugus hidroksil (—OH) atau karboksil (—C=O—) memungkinkan lebih banyak ikatan hidrogen yang terbentuk (Dai, et al., 2013), sehingga akan lebih banyak kurkuminoid yang terikat melalui ikatan hidrogen dan lebih stabil. *Malic acid* misalnya, memiliki lebih banyak gugus hidroksil (—OH) dibandingkan dengan sukrosa pada NADES MAS-H<sub>2</sub>O (1:1:18). Semakin banyak gugus hidroksil dan/ataupun karboksil dalam komponen penyusun NADES, maka akan semakin banyak kurkuminoid yang diikat melalui ikatan hydrogen sehingga kestabilan kurkuminoid akan lebih baik. Akan tetapi, lebih lanjut, kami tidak dapat menunjukkan dengan pasti apakah kurkuminoid membentuk ikatan hydrogen dengan *malic acid*, sukrosa, ataupun dengan keduanya.

Hasil menunjukkan bahwa kurkuminoid pada berbagai konsentrasi (2,00-4,00 mM) dengan pelarut NADES jenis *malic acid*-sukrosa-air (MAS-H<sub>2</sub>O = 1:1:18) pada uji MIC dengan bakteri *E. coli* maupun *S. aureus* tidak ditemukan adanya bakteri yang tumbuh, begitu pun pada saat dilakukan uji MBC juga tidak ditemukan adanya bakteri yang tumbuh. Hal ini disebabkan karena nilai pH NADES (MAS-H<sub>2</sub>O = 1:1:18) dengan komposisi asam malat ini sebesar 1,1 mengingat *E. coli* tumbuh pada pH optimum 7,0-7,5 sedangkan *S. aureus* dapat tumbuh pada pH 4,0-9,8 dan pH optimum pertumbuhannya 7,0-7,5 (Mailia, 2014). Selain itu, senyawa aktif kurkuminoid mempunyai aktivitas antibakteri berspektrum luas yaitu antibakteri yang aktif terhadap



berbagai jenis bakteri gram positif dan gram negatif, antivirus, dan penginduksi apoptosis sel (Nurina Rahmawati, 2014).

Selanjutnya pada kurkuminoid dengan konsentrasi yang sama (0 mM; 2 mM; 2,25 mM; 2,5 mM; 2,75 mM; 3 mM; 3,25 mM; 3,5 mM; 3,75 mM; 4 mM) dengan pelarut NADES jenis Fruktosa-glukosa-air (FG-H<sub>2</sub>O = 1:1:7), hasil uji MIC pada *E. coli* menunjukkan adanya penurunan nilai absorbansi sebelum dan sesudah inkubasi. Namun hasil yang berlawanan terlihat untuk bakteri *S. aureus*. Penambahan NADES jenis Fruktosa-glukosa-air (FG-H<sub>2</sub>O = 1:1:7) pada kurkuminoid menaikkan nilai absorbansi sesudah inkubasi; dan hanya pada konsentrasi kurkuminoid 3 mM saja yang mengalami penurunan absorbansi. Hasil uji MBC, kurkuminoid 3 mM terlarut dalam NADES FG-H<sub>2</sub>O (1:1:7), menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri dengan jumlah yang terlalu banyak (TNTC) setelah melewati fase waktu lebih dari 24 jam setelah inkubasi. Hal ini diakibatkan, NADES Fruktosa-glukosa-air FG-H<sub>2</sub>O (1:1:7) mengandung gula yaitu fruktosa dan, sukrosa, dimana glukosa dan fruktosa digunakan sebagai sumber karbon dan sumber energi untuk pertumbuhan sel.

Kemudian pada jenis kurkuminoid dengan konsentrasi 2,00-4,00 mM dengan pelarut NADES jenis Fruktosa-Sukrosa-air (FS-H<sub>2</sub>O = 2:1:15), hasil uji MIC menunjukkan penurunan nilai absorbansi sebelum dan sesudah inkubasi, hanya pada blanko saja yang mengalami kenaikan nilai absorbansi. Hasil uji MBC, pada kurkuminoid 2,25; 2,5; 3,5; 3,75 mM terlarut dalam NADES (FS-H<sub>2</sub>O = 2:1:15), menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri dengan jumlah yang terlalu banyak (TNTC) setelah melewati fase waktu lebih dari 24 jam setelah inkubasi.

kurkumin merupakan senyawa fenolik yang mekanisme kerjanya mirip dengan senyawa fenolik lainnya yang berfungsi sebagai antimikroba. Fenol dan senyawa turunannya telah terbukti mempunyai sifat bakteristatik dan bakterisidal sehingga sering digunakan sebagai desinfektan. Senyawa fenol bersifat aktif terhadap sel vegetatif bakteri, tetapi tidak terhadap spora bakteri. Senyawa kimia utama yang bersifat antimikroba seperti

fenol dan senyawa turunannya terbukti sebagai antibakteri dengan cara merusak dinding sel yang mengakibatkan lisis atau menghambat pembentukan komponen dinding sel pada sel yang sedang tumbuh, mengubah permeabilitas membran sitoplasma sehingga menyebabkan kebocoran nutrisi dari dalam sel, denaturasi protein sel, dan menghambat kerja enzim di dalam sel. Keaktifan fenol menurun dengan adanya pengenceran dan reaksi dengan senyawa organik lain. Senyawa fenol sangat aktif pada pH asam. (Abdullatif, 2016).

Maka pada hasil tersebut variabel NADES jenis MAS air (MAS-H<sub>2</sub>O = 1:1:18) + kurkumin bersifat bakterisidal, yaitu mampu membunuh bakteri karena tidak adanya bakteri yang terdeteksi setelah melewati fase waktu lebih dari 24 jam setelah inkubasi. Sedangkan untuk variabel NADES jenis FG-H<sub>2</sub>O (1:1:7) dan (FS-H<sub>2</sub>O = 2:1:15) dengan penambahan variasi konsentrasi kurkuminoid terlarut, bersifat bakteriostatik karena hanya mampu menghambat pertumbuhan bakteri pada 24 jam awal setelah inkubasi. Namun pada waktu setelahnya, bakteri tersebut dapat tumbuh kembali.

## V KESIMPULAN DAN SARAN

### V.1 Kesimpulan

1. Hasil uji MIC pada variabel NADES MAS-H<sub>2</sub>O (1:1:18) pada berbagai konsentrasi kurkumin dan blanko menunjukkan adanya penghambatan terhadap bakteri baik *E. Coli* ataupun *S. Aureus*. NADES FG-H<sub>2</sub>O (1:1:7) dengan 2 mM kurkumin menunjukkan MIC untuk *E.Coli*. Sedangkan untuk *S. Aureus* dengan NADES yang sama dan konsentrasi kurkumin 2-4 mM, belum ditemukan adanya MIC. NADES FS-H<sub>2</sub>O (2:1:15) dengan 2 mM kurkumin menunjukkan MIC baik untuk *E.Coli* ataupun *S. Aureus*.
2. Hasil uji MBC pada variabel NADES MAS-H<sub>2</sub>O (1:1:18), MAS-H<sub>2</sub>O (1:1:18) blanko (tanpa kurkumin terlarut didalam NADES) dan MA-H<sub>2</sub>O (1:18) menunjukkan adanya pembasmian bakteri baik pada *E. coli* ataupun *S. aureus*, sedangkan S-H<sub>2</sub>O (1:1:18) terdapat pertumbuhan bakteri. NADES FG-H<sub>2</sub>O (1:1:7) dan FS-H<sub>2</sub>O (2:1:15) pada berbagai konsentrasi kurkumin (2-4 mM) tidak menunjukkan adanya MBC.
3. NADES (MAS-H<sub>2</sub>O) memiliki aktivitas anti-mikroba paling efektif dibandingkan dengan tipe netral (FG-H<sub>2</sub>O dan FS-H<sub>2</sub>O). Toksisitas NADES MAS-H<sub>2</sub>O ini dipengaruhi oleh pH NADES. Asam malat adalah asam kuat (pH < 3), sementara NADES mengandung gula memiliki pH > 5.

### V.2 Saran

Saran untuk penelitian selanjutnya:

1. Pada uji MBC, perlu dilakukan pengenceran bakteri terlebih dahulu agar jumlah bakteri ketika dihitung

menggunakan *counting chamber* dapat dengan mudah dilakukan.

2. Analisis lanjut untuk pengaruh NADES terhadap proses terjadinya lisis bakteri.
3. Mekanisme plasmolisis pada sel bakteri akibat perbedaan tekanan osmotik terjadi karena adanya kandungan konsentrasi gula yang tinggi pada larutan. Namun, perlu adanya penelitian lebih lanjut untuk membuktikan mekanisme tersebut pada penelitian ini.



## DAFTAR PUSTAKA

- Abdullatif, 2016. *DAYA HAMBAT EKSTRAK RIMPANG KUNYIT (Curcuma domestica Val.) TERHADAP PERTUMBUHAN Staphylococcus aureus DAN Staphylococcus epidermidis SECARA In Vitro*, Semarang: UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SEMARANG.
- Anand, P., Aggarwal, B. B., Kunnumakkara, A. B. & Newman, R. A., 2007. Bioavailability of Curcumin: Problems and Promises. *Reviews Molecular Pharmaceutics*, p. 807.
- Araujo, P., 2009. Key Aspects of Analytical Method Validation and Linearity Evaluation. *Journal of Chromatography B*, pp. 2224-2234.
- Bagchi, A., 2015. Extraction of Curcumin. *IOSR Journal of Environmental Science*, pp. 1-16.
- Banerjee, C. et al., 2014. Effect of Encapsulation of Curcumin in Polymeric Nanoparticles (NPs): How Efficient to Control ESIPT Process?. *Langmuir* 30, pp. 10834-10844.
- Bhatt, J. & Mondal, D., 2015. Preparation of bio-deep eutectic solvent triggered cephalopod shaped silver chloride-DNA hybrid material having antibacterial and bactericidal activity. *Materials Science and Engineering C* 56, pp. 125-131.
- Butler, M., 2004. *Animal cell culture and technology*. New York: 2nd edn. Garland Science/Bios Scientific Publishers.
- Chan, C. C., Lam, H., Lee, Y. C. & Zhang, X.-M., 2004. *Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification*. New Jersey: A John Wiley & Sons, Inc..
- Choi, Y. H., Spronsen, J. v. & Dai, Y., 2011. Are Natural Deep Eutectic Solvents the Missing Link in. *Plant Physiology*, August 2011, Vol. 156, pp. 1701-1705.
- Choi, Y. H., Spronsen, J. v. & Dai, Y., 2011. Are Natural Deep Eutectic Solvents the Missing Link in Understanding

- Cellular Metabolism and Physiology. *Plant Physiology*, August 2011, Vol. 156, pp. 1701-1705.
- Dai, Y. et al., 2013. Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Analytica Chimica Acta*, pp. 61-68.
- Eva, D. D., 2015. POTENTIAL EXTRACT CURCUMA (Curcuma xanthorrhizal, Roxb) AS ANTIBACTERIALS. *J MAJORITY*, pp. 5-11.
- Fauziyah, R. & Widiana, W., 2017. Ekstraksi Kurkuminoid dari Rimpang Curcuma mangga menggunakan Natural Deep Eutectic Solvents (NADES) Golongan Ionik dan Netral. *Skripsi Institut Teknologi Sepuluh Nopember*, p. 52.
- Fazriyah, L. J. & Seftiyani, N. H., 2017. Pengaruh Kandungan Air terhadap Perolehan Yield Kurkuminoid dari Rimpang Curcuma mangga menggunakan Natural Deep Eutectic Solvents (NADES). *Skripsi Institut Teknologi Sepuluh Nopember*, p. 59.
- Hakeem, M. O. & Orito, R., 2008. Estimating the Eutectic Composition of Simple Binary Alloy System Using Linear Geometry. *Leonardo Journal of Sciences*, pp. 232-242.
- Harada, T. et al., 2011. Cooperative Binding and Stabilization of the Medicinal Pigment Curcumin by Diamide Linked  $\gamma$ -Cyclodextrin Dimers: A Spectroscopic Characterization. *J. Phys. Chem. B*, 2011, 115, pp. 1268-1274.
- Hayyan, H. et al., 2013. Assessment of cytotoxicity and toxicity for phosphonium-based deep eutectic solvents. *Chemosphere*, Volume 93, pp. 455-459.
- Heger, M., van Golen, R. F., Broekgaarden, M. & Michel, M. C., 2014. The Molecular Basis for the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Curcumin and Its Metabolites in Relation to Cancer. *PHARMACOLOGICAL REVIEWS*, Issue 66, pp. 222-307.
- ICH, 1995. Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology. *Note for Guidance on Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology*, pp. 1-15.

- ISO-VIM, 2004. International Vocabulary of Basic and General Terms in Metrology (VIM). *DGuide 99999*, pp. 1-55.
- Jayandran, M., Muhamed, H. M. & Balasubramanian, V., 2015. Synthesis Characterization and Comparative Studies. *Asian Journal of Pharmaceutical Science & Technology*, pp. 18-19.
- K., 2015. Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI. *INFODATIN*, pp. 1-6.
- Kumavat, S. D. et al., 2013. Degradation Studies of Curcumin. *International Journal of Pharmacy Review & Research*, pp. 50-55.
- Kumila, S. S., Widayat & Cahyono, B., 2016. Validasi Spektrofotometri UV-Vis untuk Penentuan Kurkuminoid dalam Produk Herbal. *Seminar Nasional Kimia dan Pendidikan Kimia VIII*, pp. 107-113.
- Kusuma, S. A. F., 2010. Escherichia coli. *Makalah*, pp. 1-11.
- Lestari, M. & Indrayanto, G., 2014. Curcumin. *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related*, pp. 113-198.
- Lolongan, R. A., Waworuntu, O. & Mintjelungan, C. N., 2016. Jurnal e-GiG. *Uji konsentrasi hambat minimum (KHM) ekstrak daun pacar air (Impatiens balsamina L.) terhadap pertumbuhan Streptococcus mutans*, pp. 242-247.
- Mailia, R., 2014. *KETAHANAN PANAS CEMARAN Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus dan BAKTERI PEMBENTUK SPORA yang DIISOLASI DARI PROSES PEMBUATAN TAHU DI SUDAGARAN YOGYAKARTA*, Yogyakarta: UGM.
- Mai-Prochnow, A. et al., 2014. Atmospheric pressure plasmas: Infection control and bacterial responses. *International journal of antimicrobial agents*, Volume 43, pp. 508-517.
- Mbous, Y. & Hayyan, M., 2017. Unraveling the cytotoxicity and metabolic pathways of binary natural deep eutectic solvent systems. *Sci Rep 7*, p. 41257.
- Mondal, S., Ghosh, S. & Moulik, S. P., 2016. Stability of Curcumin in Different Solvent and Solution Media : UV-Visible and



- Steady State Fluorescence Spectral Study. *Journal of Photochemistry & Photobiology* 158, pp. 212-218.
- Ningrum, E. T. & Amelinda, R., 2017. Ekstraksi Kurkuminoid dari Rimpang Curcuma mangga menggunakan Natural Deep Eutectic Solvents (NADES) Golongan Asam dan Basa. *Skripsi Institut Teknologi Sepuluh Nopember*, p. 54.
- N. & Saktia, U. M., 2017. Ekstraksi Senyawa Bioaktif dari Rimpang Curcuma mangga menggunakan Pelarut Ramah Lingkungan Natural Deep Eutectic Solvent (NADES). *Skripsi Institut Teknologi Sepuluh Nopember*, p. iii.
- Nurina Rahmawati, E. S. d. E. W., 2014. Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan. *Uji aktivitas antibakteri ekstrak herbal terhadap bakteri Escherichia coli*, pp. 24-31.
- Nurrochmad, A., 2004. The New Paradigm of Curcumin and Its Anticancer Activity. *Review Biofarmasi*, pp. 75-80.
- Opsvik, K., Bruzell, E., Tonnesen, H. H. & W., 2015. Characterization and Antimicrobial Phototoxicity of Curcumin Dissolved in Natural Deep Eutectic Solvents. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 80, pp. 26-32.
- Owuama, C. I., 2017. African Journal of Microbiology Research. *Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) using a novel dilution tube method*, pp. 978-980.
- Pandiangan, M., 2008. Stabilitas Antimikroba Ekstrak Temulawak. *STABILITAS ANTIMIKROBA EKSTRAK TEMULAWAK (Curcuma xanthoriza Roxb.) TERHADAP MIKROBA PATOGEN*, pp. 365-373.
- Patra, D. & Sleem, F., 2013. A new method for pH triggered curcumin release by applying poly(l-lysine) mediated nanoparticle-congregation. *Analytica Chimica Acta*, pp. 60-68.
- Paulucci, V. P., Couto, R. O., Teixeira, C. C. C. & Freitas, L. A. P., 2013. Optimization of the extraction of curcumin from

- Curcuma longa rhizomes. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, pp. 94-100.
- Perrone, D. et al., 2015. *Exp Ther Med. Biological and Therapeutic Activities and Anticancer Properties of Curcumin*, pp. 1615-1623.
- Prescott, H., 2002. *Laboratory Exercises in Microbiology*. s.l.:The McGraw-Hill Companies.
- Prescott, H., 2002. *Laboratory Exercises in Microbiology*. 5th ed. s.l.:The McGraw-Hill.
- Prima, A. & Handajani, P. T., 2013. EFEK ANTIBAKTERI CURCUMIN DAN PROTOCATECHUIC ACID TERHADAP Klebsiella pneumonia EXTENDED SPECTRUM BETALACTAMASE YANG DIISOLASI DARI SPUTUM PENDERITA BATUK KRONIS. *JURNAL KEDOKTERAN SYIAH KUALA*, pp. 128-138.
- Prochnow, A. M., Clauson, M., Hong, J. & Murphy, A. B., 2016. Gram positive and Gram negative bacteria differ in their sensitivity to cold plasma. *Scientific Reports*, Volume 6, pp. 1-11.
- Pushpakumari, Varghese, N. & Kottol, K., 2014. PURIFICATION AND SEPERATION OF INDIVIDUAL CURCUMINOIDS FROM SPENT TURMERIC OLEORESIN, A BY- PRODUCT FROM CURCUMIN PRODUCTION INDUSTRY. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, pp. 3246-3254.
- Qasba, P. K., Kumar, S. & Brew, D. K., 2008. Molecular Divergence of Lysozymes and  $\alpha$ -Lactalbumin. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 32(4), pp. 255-306.
- Radosevic, K. & Canak, I., 2017. Antimicrobial, Cytotoxic and Antioxidative Evaluation of Natural Deep Eutectic Solvents. *Environmental Science and Pollution Research*, pp. 1-9.
- Rezki, R. S., Anggoro, D. & MZ, S., 2015. Ekstraksi Multitahap Kurkumin dari Kunyit (*Curcuma domestica* Valet)

- menggunakan Pelarut Etanol. *Jurnal Teknik Kimia USU*, pp. 29-34.
- Riyanto, 2014. *Validasi dan verifikasi metode uji*. Yogyakarta: deepublish.
- Setiawan, I. F., 2010. Penentuan Kadar Kurkuminoid dalam Kunyit dengan Spektrofotometri Derivatif. *Skripsi Institut Pertanian Bogor*, p. 3.
- Sharma, K., Agrawal, S. S. & Gupta, M., 2012. Development and Validation of UV spectrophotometric Method for the Estimation. *International Journal of Drug Development & Research*, pp. 375-380.
- Thiel, T., 1999. *Science in the Real World: Microbes in Action*. St. Louis: s.n.
- Tonnesen, H. H. & Karlsen, J., 1985. Studies on Curcumin and Curcuminoids (VI. Kinetics of Curcumin Degradation in Aqueous Solution). *Lebensm Unters Forsch* 180, pp. 402-404.
- Wang , Y.-J.et al., 1997. Stability of Curcumin in Buffer Solutions and Characterization of Its Degradation Products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, pp. 1867-1876.
- Wasitaningrum, I. D. A., 2009. *UJI RESISTENSI BAKTERI Staphylococcus aureus dan Escherichia coli DARI ISOLAT SUSU SAPI SEGAR TERHADAP BEBERAPA ANTIBIOTIK*, SURAKARTA: FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SURAKARTA .
- Wen, Q. & Chen, J., 2015. Assessing the toxicity and biodegradability of deep eutectic solvents. *Chemosphere* 132, pp. 63-69.
- Wikene, K. & Hakon, V., 2017. Investigation of the antimicrobial effect of natural deep eutectic solvents (NADES) as solvents in antimicrobial photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B Biol* 171, pp. 27-33.
- Wikene, K. O., 2017. *Investigation of supersaturated and solubilising preparations of poorly water-soluble photosensitisers intended for antimicrobial photodynamic*

*therapy: Natural deep eutectic solvents and solid dispersions*, Norwegia: University of Oslo.

- Wikene, K. O., Bruzell, E. & Tonnesen, H. H., 2015. Characterization and Antimicrobial Phototoxicity of Curcumin Dissolved in Natural Deep Eutectic Solvents. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 80, pp. 26-32.
- Yilmaz, M. T., 2012. Minimum Inhibitory and Minimum Bactericidal Concentrations of Boron Compounds Against Several Bacterial Strains. *Turk J Med Sci*, pp. 1423-1429.
- Yuliati, 2016. UJI EFEKTIVITAS EKSTRAK KUNYIT SEBAGAI ANTIBAKTERI DALAM PERTUMBUHAN *Bacillus* sp dan *Shigella dysenteriae* SECARA IN VITRO. *Jurnal Profesi Medika*, pp. 26-32.
- Yuwono, M. & Indrayanto, G., 2005. Validation of Chromatographic Methods of Analysis. In: *Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology, Volume 32*. Surabaya: Elsevier Inc, pp. 243-259.
- Zhao, B. & Xu, P., 2015. Biocompatible deep eutectic solvents based on choline chloride: characterization and application to the extraction of rutin from *Sophora japonica*. *ACS Sustain Chem Eng* 3, pp. 2746-2755.

## BIOGRAFI PENULIS I



Galang Ramdhani Fitra Gama lahir di Surabaya, Jawa Timur 06 Maret 1994. Penulis menempuh pendidikan formal di SD Muhammadiyah 11 Surabaya, SMP Negeri 5 Surabaya, SMA Negeri 7 Surabaya, jenjang Diploma III Jurusan Teknik Kimia di Institut Teknologi Sepuluh Nopember tahun 2012-2016, kemudian melanjutkan jenjang

Strata I Jurusan Teknik Kimia di Institut Teknologi Sepuluh Nopember tahun 2016-2018. Penulis melakukan penelitian di Laboratorium Biomassa dan Konversi Energi bersama rekannya Zandhika Alfi Pratama, yang dibimbing oleh Prof. Ir. H. M. Rachimoellah, Dipl.Est dan Orchidea Rachmaniah, S.T.,M.T, dengan judul "**Uji Antimikroba Kurkuminoid Terlarut dalam *Natural Deep Eutectic Solvents* (NADES)**". Penulis menyelesaikan tugas Pra-Design "**Pabrik Pembuatan Garam Industri Dari Air Laut Dengan Metode Kombinasi Prisma Geomembran Dan *Vacuum Pan* Berbasis *Fair-Trade***". Penulis juga melakukan kerja praktik di PT. Petrokimia Gresik pada Agustus 2017. Apabila ada kritik dan saran yang membangun tentang penelitian ini, maka pembaca dapat menghubungi penulis via email: [galang.rfg12@gmail.com](mailto:galang.rfg12@gmail.com)

## BIOGRAFI PENULIS II



Zandhika Alfi Pratama lahir di Cirebon, Jawa Barat 16 Juli 1995. Penulis menempuh pendidikan formal di SD Negeri Pucang Jajar II, SMP Negeri 6 Surabaya, SMA Darul Ulum 2 BPPT Jombang, jenjang Diploma III Jurusan Teknik Kimia di Institut Teknologi Sepuluh Nopember tahun 2013-2016, kemudian melanjutkan jenjang Strata I Jurusan Teknik Kimia di Institut Teknologi Sepuluh Nopember tahun 2016-2018. Penulis melakukan penelitian di Laboratorium Biomassa

dan Konversi Energi bersama rekannya Galang Ramdhani Fitra Gama, yang dibimbing oleh Prof. Ir. H. M. Rachimoella, Dipl.Est dan Orchidea Rachmaniah, S.T.,M.T, dengan judul **”Uji Antimikroba Kurkuminoid Terlarut dalam *Natural Deep Eutectic Solvents (NADES)*”**. Penulis menyelesaikan tugas Prad-Design **”Pabrik Pembuatan Garam Industri Dari Air Laut Dengan Metode Kombinasi Prisma Geomembran Dan *Vacuum Pan* Berbasis *Fair-Trade*”**. Penulis juga melakukan kerja praktik di PT. Petrokimia Gresik pada Agustus 2017. Apabila ada kritik dan saran yang membangun tentang penelitian ini, maka pembaca dapat menghubungi penulis via email: [zandhikaalfipratama@gmail.com](mailto:zandhikaalfipratama@gmail.com)

## APPENDIKS A

### PERHITUNGAN PEMBUATAN NADES

#### A.1 Pembuatan NADES

- > Membuat NADES MAS-H<sub>2</sub>O 1:1:18 dalam 50 gram

Massa <i>Malic Acid</i>	=	8,3732 gram
Massa Sukrosa	=	21,3764 gram
Massa Air	=	20,2504 gram
Massa total NADES	=	50,0000 gram
BM <i>Malic Acid</i>	=	134,0800 gram
BM Sukrosa	=	342,3000 gram
BM Air	=	18,0150 gram

- > Menghitung fraksi massa NADES

$$\begin{aligned} \text{Fraksi massa } \textit{Malic Acid} &= \frac{\text{massa } \textit{Malic Acid}}{\text{massa total NADES}} \\ &= \frac{8,3732}{50,0000} = 0,1675 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Fraksi massa Sukrosa} &= \frac{\text{massa Sukrosa}}{\text{massa total NADES}} \\ &= \frac{21,3764}{50,0000} = 0,4275 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Fraksi massa Air} &= \frac{\text{massa Air}}{\text{massa total NADES}} \\ &= \frac{20,2504}{50,0000} = 0,4050 \end{aligned}$$

> Menghitung mol

$$\begin{aligned} \text{mol } \textit{Malic Acid} &= \frac{\text{massa } \textit{Malic Acid}}{\text{BM } \textit{Malic Acid}} \\ &= \frac{8,3732}{134,0800} = 0,06245 \text{ mol} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{mol Sukrosa} &= \frac{\text{massa Sukrosa}}{\text{BM Sukrosa}} \\ &= \frac{21,3764}{342,3000} = 0,0624 \text{ mol} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{mol Air} &= \frac{\text{massa Air}}{\text{BM Air}} \\ &= \frac{20,2504}{18,0150} = 1,1241 \text{ mol} \end{aligned}$$

$$\text{mol total NADES} = 1,1865 \text{ mol}$$

> Menghitung fraksi mol

$$\begin{aligned} \text{fraksi mol } \textit{Malic Acid} &= \frac{\text{mol } \textit{Malic Acid}}{\text{mol total NADES}} \\ &= \frac{0,0624}{1,1865} = 0,053 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{fraksi mol Sukrosa} &= \frac{\text{mol Sukrosa}}{\text{mol total NADES}} \\ &= \frac{0,0624}{1,1865} = 0,053 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{fraksi mol Air} &= \frac{\text{mol Air}}{\text{mol total NADES}} \\ &= \frac{1,1241}{1,1865} = 0,947 \end{aligned}$$



> Menghitung mol ratio

$$\text{mol ratio } \textit{Malic Acid} = \frac{\text{fraksi mol } \textit{Malic Acid}}{\text{fraksi mol } \textit{Malic Acid}}$$

$$= \frac{0,0526}{0,0526} = 1$$

$$\text{mol ratio Sukrosa} = \frac{\text{fraksi mol Sukrosa}}{\text{fraksi mol } \textit{Malic Acid}}$$

$$= \frac{0,0526}{0,0526} = 1$$

$$\text{mol ratio Air} = \frac{\text{fraksi mol Air}}{\text{fraksi mol } \textit{Malic Acid}}$$

$$= \frac{0,9474}{0,0526} = 18$$

Dengan cara perhitungan yang sama dilakukan untuk jenis NADES lainnya

**Tabel A.1 Rasio NADES**

NADES	Rasio mol	Massa (gram)	
MAS-H <sub>2</sub> O	1 : 1 : 18	<i>Malic acid</i>	8,3732
		Sukrosa	21,3764
		Air	20,2504
FG-H <sub>2</sub> O	1 : 1 : 7	Fruktosa	18,5188
		Glukosa	18,5188
		Air	12,9624
FS-H <sub>2</sub> O	2 : 1 : 15	Fruktosa	18,5189
		Sukrosa	17,5927
		Air	13,8884







## APPENDIKS B

### PERHITUNGAN PROPERTIES BAHAN

**Tabel 1** Optical Density pada kurkumin dengan berbagai konsentrasi terlarut dalam NADES jenis Fruktosa-Glukosa-air (FG-H<sub>2</sub>O = 1:1:7) pada *S.Aureus* dan *E.Coli*.

No.	Nama Sampel	<i>Eschericia coli</i>			<i>Staphylococcus aureus</i>		
		0 jam	24 jam	$\Delta$ OD <sup>α</sup>	0 jam	24 jam	$\Delta$ OD <sup>α</sup>
1	Blanko G	N.M <sup>β</sup>	N.M	N.M	N.M	N.M	N.M
2	Blanko F	N.M	N.M	N.M	N.M	N.M	N.M
3	0 Mm	0,238	0,226	-0,012	0,241	0,437	0,196
4	2 Mm	0,322	0,298	-0,024	0,209	0,284	0,075
5	2,25 Mm	0,304	0,274	-0,030	0,274	0,313	0,039
6	2,5 Mm	0,346	0,274	-0,072	0,214	0,232	0,018
7	2,75 Mm	0,277	0,263	-0,014	0,215	0,298	0,083
8	3 Mm	0,380	0,233	-0,147	0,214	0,204	-0,010
9	3,25 Mm	0,250	0,229	-0,021	0,203	0,297	0,094
10	3,5 Mm	0,288	0,198	-0,090	0,214	0,242	0,028
11	3,75 Mm	0,303	0,225	-0,078	0,211	0,256	0,045
12	4 Mm	0,284	0,180	-0,104	0,232	0,264	0,032

<sup>α</sup>OD bernilai positif (+) menunjukkan adanya pertambahan jumlah bakteri setelah inkubasi 24 jam; dan

OD bernilai negatif (-) menunjukkan adanya pengurangann jumlah bakteri setelah inkubasi 24 jam.

<sup>β</sup>N.M = not measured; pertumbuhan bakteri pada larutan blanko G dan F dilakukan secara MBC (**subbab IV.2**).

**Tabel 2** Optical Density pada kurkumin dengan berbagai konsentrasi terlarut dalam NADES jenis Fruktosa-Sukrosa-air (FS-H<sub>2</sub>O = 2:1:15) pada *S. Aureus* dan *E.Coli*

No.	Nama Sampel	<i>Eschericia coli</i>			<i>Staphylococcus aureus</i>		
		0 jam	24 jam	$\Delta OD^\alpha$	0 jam	24 jam	$\Delta OD^\alpha$
1	0 Mm	0,351	0,435	0,084	0,301	0,417	0,116
2	2 mM	0,348	0,201	-0,147	0,308	0,196	-0,112
3	2,25 mM	0,372	0,293	-0,079	0,241	0,112	-0,129
4	2,5 mM	0,499	0,368	-0,131	0,298	0,202	-0,096
5	2,75 mM	0,443	0,284	-0,159	0,264	0,124	-0,140
6	3 mM	0,442	0,292	-0,150	0,326	0,195	-0,131
7	3,25 mM	0,468	0,291	-0,177	0,298	0,131	-0,167
8	3,5 mM	0,426	0,223	-0,203	0,316	0,144	-0,172
9	3,75 mM	0,462	0,359	-0,103	0,376	0,191	-0,185
10	4 mM	0,436	0,345	-0,091	0,318	0,195	-0,123

$^\alpha OD$  bernilai positif (+) menunjukkan adanya penambahan jumlah bakteri setelah inkubasi 24 jam; dan  $OD$  bernilai negatif (-) menunjukkan adanya pengurangan jumlah bakteri setelah inkubasi 24 jam.