

**AKTIVITAS ANTIBAKTERI DAN PROFIL BIOAUTOGRAFI FRAKSI
ETIL ASETAT DAUN PULUTAN (*Urena lobata* L) TERHADAP BAKTERI
*Staphylococcus aureus***

SKRIPSI

Diajukan Untuk Memenuhi Salah Satu Syarat
Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi (S.Farm)
Program Studi S1 Farmasi



Diajukan oleh :

HARMINA MEY SANTI

NIM : 16.0605.0012

PROGRAM STUDI S1 FARMASI

FAKULTAS ILMU KESEHATAN

UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH MAGELANG MAGELANG

2020

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar belakang

Penyakit infeksi ialah penyakit yang disebabkan oleh masuk dan berkembangnya suatu kelompok luas dari organisme mikroskopik yang terdiri dari satu atau banyak sel seperti bakteri, fungi, dan parasit serta virus. Penyakit infeksi terjadi ketika interaksi dengan mikroba menyebabkan kerusakan pada tubuh host dan kerusakan tersebut menimbulkan berbagai gejala dan tanda klinis. Sekarang ini penyakit infeksi merupakan salah satu masalah kesehatan yang paling utama di negara-negara berkembang termasuk Indonesia. Berdasarkan Survei Kesehatan Rumah Tangga Tahun 2007, 28,1 % kasus kematian disebabkan oleh penyakit infeksi dan parasit (Aniq, 2015). Salah satu bakteri penyebab infeksi adalah bakteri *Staphylococcus aureus*. *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri gram positif yang paling umum menyebabkan infeksi pada manusia. Infeksi yang disebabkan oleh *Staphylococcus aureus* antara lain pneumonia, perikarditis, osteomielitis, pielonefritis, dan abses ginjal. selain itu *Staphylococcus aureus* memiliki tingkat infeksi yang tinggi dan resistensi yang tinggi terhadap antibiotik (Yang, Huang, & Zou, 2017).

Penggunaan antibiotik dalam pengobatan infeksi sering kali menimbulkan beberapa masalah, antara lain timbulnya efek samping, resistensi dan lain-lain. Dalam hal penanganan infeksi, perlu diupayakan untuk menggunakan beberapa alternatif yang dapat mengurangi kejadian resistensi maupun timbulnya efek samping. Dengan potensi alam yang dimiliki Indonesia, penggunaan obat

tradisional yang berasal dari alam dapat dijadikan alternatif untuk pengobatan infeksi sebagai pengganti antibiotik (Wulandari, Utami, & Hartanti, 2009).

Tanaman pulutan (*Urena lobata* L) merupakan tanaman herba seperti semak yang tumbuh di iklim tropis dan termasuk dalam famili Malvaceae (Maisaroh, 2015). Ekstrak metanol daun pulutan menunjukkan adanya alkaloid, flavonoid saponin dan tanin (Mane., 2016). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh (Wulandari *et al.*, 2009) diketahui bahwa ekstrak daun pulutan (*Urena lobata* L) mempunyai aktifitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* pada konsentrasi 10mg/ml, 15mg/ml, dan 20 mg/ml. sedangkan pada bakteri *Escherichia coli* terdapat pada konsentrasi 10mg/ml dan 15 mg/ml.

Ekstraksi merupakan cara untuk memperoleh senyawa kimia yang ada pada tanaman. Senyawa kimia yang dihasilkan dari proses ekstraksi biasanya masih berupa campuran dari berbagai senyawa kimia, sehingga sulit untuk menentukan senyawa mana yang memang bermanfaat dalam menghambat antibakteri. Untuk itu peneliti bermaksud melakukan fraksinasi untuk memisahkan golongan senyawa berdasarkan kepolarannya, dalam penelitian ini digunakan etil asetat yang merupakan pelarut yang bersifat semi polar, pelarut ini akan melarutkan senyawa yang bersifat semi polar seperti alkaloid yang diduga memiliki aktivitas antibakteri pada daun pulutan. Yang selanjutnya akan di uji bioautografi untuk mengetahui golongan senyawa apa yang bermanfaat sebagai antibakteri.

B. Rumusan masalah

1. Apakah fraksi etil asetat daun pulutan (*Urena lobata* L.) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*?
2. Bagaimanakah profil bioautografi fraksi etil asetat daun pulutan (*Urena lobata* L.)?

C. Tujuan penelitian

1. Untuk mengetahui aktivitas antibakteri fraksi etil asetat daun pulutan (*Urena lobata* L.) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*
2. Untuk mengetahui profil bioautografi fraksi etil asetat daun pulutan (*Urena lobata* L.) .

D. Manfaat

1. Bagi Peneliti

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan wawasan dan menambah pengalaman dalam menerapkan ilmu yang didapat selama kuliah kedalam praktik nyata.

2. Bagi Masyarakat

Dari hasil penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat bagi masyarakat tentang aktivitas antibakteri pada daun pulutan (*Urena lobata* L) sehingga penggunaannya dapat ditanggungjawabkan secara ilmiah.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Pulutan (*Urena lobata* L)

1. Klasifikasi Tanaman (Babu *et al.*, 2016)

Devisi	:Spermatophita
Sub devisi	:Angiospermae
Kelas	:Dicotyledoneae
Bangsa	:Malveles
Suku	:Malvaceae
Marga	:Urena
Jenis	: <i>Urena lobata</i> L



Gambar 1. Tumbuhan Pulutan
(sumber : bibit bunga.com)

2. Nama Daerah

Indonesia: sampelulut (Batak); pulut, pulut laki-laki (Bangka); pulut-pulut (Sumatera Barat); pungpulutan, pungpulutan awe- we, pungpurutan (Sunda); legetan, pulutan pulutan kebo, pulutan sapi (Jawa); polot (Madura); kapuhak, kaporata (Sumba); bejak, kakamomoko, kokomomoko (Halmahera); taba toko

(Ternate). Asing: ampulut-pulut (Malaysia), di tao hum (China).(Badrunasar & Santoso, 2017)

3. Deskripsi Tanaman

Tanaman pulutan (*Urena lobata* L) berasal dari keluarga malvaceae, sejenis herba atau semi kayu, tanamn pulutan hidup didaerah tropis dan subtropis, tumbuh didaerah yang lembab, dan paling baik hidup di tempat yang panas, dengan sinar matahari langsung dan tanah yang subur serta drainase yang baik. Tanaman ini ditemukan hidup liar didaerah tropis. Hidup di Amerika utara, Amerika selatan, dan di Asia seperti Indonesia dan Filipina juga di Afrika. Cabang-cabang ditutupi dengan sedikit rambut yang kasar dan bunga berwarna merah muda, bentuk daun biasanya bulat panjang atau bulat telur, panjangnya hingga 10 – 15 cm (Mane., 2016)

4. Kandungan Kimia Tanaman

Kandungan tanaman pulutan antara lain flavonoid, glycoside, β -sitosterol, stigmasterol, furocoumarin, imperatorin, mangiferin dan quercetin. kaempferol, luteolin, hypolatin dan gossypetin. Akar tanaman pulutan mengandung karbohidrat 33%, protein 1.9%, lemak 1,8%, efedrin, sedangkan daun pulutan mengandung alkaloid, dan flavonoid (Mane., 2016)

5. Manfaat Tanaman

a. Secara Empiris

Secara tradisional daun dan akar pulutan digunakan untuk bernagai macam pengobatan seperti obat kolik, malaria, gonorrhoea, obat luka, demam, sakit gigi dan rematik.(Babu *et al.*, 2016)

b. Secara Ilmiah

Secara ilmiah daun pulutan berfungsi sebagai antimikroba, analgesik, antioksidan, dan anti diabetes, ekstrak biji tanaman pulutan bisa digunakan sebagai obat antidiare, ekstrak methanol tanaman pulutan sebagai imunodulator selain itu ekstrak methanol menunjukkan aktivitas antibakteri. (Babu *et al.*, 2016)

B. Antibakteri

1. Pengertian Antibakteri

Antibakteri merupakan zat yang dapat mengganggu pertumbuhan atau bahkan mematikan bakteri dengan cara mengganggu metabolisme mikroba yang merugikan (Dwidjoseputro, 1980 dalam Febrianasari, 2018)

2. Mekanisme Kerja Antibakteri

Mekanisme kerja antibakteri dalam menghambat pertumbuhan mikroorganisme digolongkan sebagai berikut: (Radji, 2016 dalam Febrianasari, 2018)

a. Menghambat sintesis dinding sel

Dinding sel bakteri sangat penting untuk mempertahankan struktur sel bakteri. Oleh karena itu, zat yang dapat merusak dinding sel akan melisiskan dinding sel sehingga dapat mempengaruhi bentuk dan struktur sel, yang pada akhirnya dapat membunuh sel bakteri tersebut

b. Merusak membran sel

Membran sel mempunyai peranan penting dalam mengatur transportasi nutrisi dan metabolit yang dapat keluar masuk sel. Membran sel juga

berfungsi sebagai tempat berlangsungnya respirasi dan aktivitas biosintesis dalam sel. Beberapa jenis antibakteri dapat mengganggu membran sel sehingga dapat mempengaruhi kehidupan sel bakteri.

c. Mengganggu atau merusak membran sel

Membran sel mempunyai peranan penting dalam mengatur transportasi nutrisi dan metabolit yang dapat keluar masuk sel. Membran sel juga berfungsi sebagai tempat berlangsungnya respirasi dan aktivitas biosintesis dalam sel. Beberapa jenis antibakteri dapat mengganggu membran sel sehingga dapat mempengaruhi kehidupan sel bakteri

d. Mengganggu biosintesis asam nukleat

Proses replikasi DNA di dalam sel merupakan siklus yang sangat penting bagi kehidupan sel. Beberapa jenis antibakteri dapat mengganggu metabolisme asam nukleat tersebut sehingga mempengaruhi seluruh fase pertumbuhan sel bakteri.

e. Antibakteri yang menghambat sintesis protein

Sintesis protein merupakan suatu rangkaian proses yang terdiri atas proses transkripsi (yaitu DNA ditranskripsi menjadi mRNA) dan proses translasi (yaitu mRNA ditranslasi menjadi protein). Antibakteri dapat menghambat proses-proses tersebut akan menghambat sintesis protein

C. *Staphylococcus aureus*

1. Klasifikasi *Staphylococcus aureus* (Febrianasari, 2018)

Klasifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* adalah sebagai berikut :

Kindom	: Eubacteria
Filum	: Firmicutes
Classis	: Bacilli
Ordo	: Bacillales
Family	: <i>Staphylococcaceae</i>
Genus	: <i>Staphylococcus</i>
Species	: <i>Staphylococcus aureus</i> Rosenbach

2. Morfologi

Bakteri *Staphylococcus aureus* berbentuk bulat. Koloni mikroskopik cenderung berbentuk menyerupai buah anggur. Menurut bahasa Yunani, Staphyle berarti anggur dan coccus berarti bulat atau bola. Salah satu spesies menghasilkan pigmen warna kuning emas sehingga dinamakan *aureus* (berarti emas, seperti matahari). Bakteri ini dapat tumbuh dengan atau tanpa bantuan oksigen.(Febrianasari, 2018)

3. Karakteristik

Bakteri *Staphylococcus aureus* bersifat patogen pada manusia. *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri Gram-positif berbentuk bulat dan berdiameter 0,8-1,0 mikron, tidak bergerak, dan tidak berspora. Bakteri ini merupakan bakteri gram positif yang memiliki dinding sel luar yang tebal yang terbuat dari polimer kompleks yang disebut peptidoglikan. Bakteri gram positif

memiliki lapisan kandungan lipid yang rendah yaitu hanya sebesar 1-4% (Febrianasari, 2018)

D. Ekstraksi dan Fraksinasi

1. Ekstraksi

Ekstraksi adalah suatu proses yang dilakukan untuk memperoleh kandungan senyawa kimia dari jaringan tumbuhan maupun hewan. Ekstrak adalah sediaan kering, kental atau cair dibuat dengan menyari simplisia nabati atau hewani menurut cara yang cocok, di luar pengaruh cahaya matahari langsung, ekstrak kering harus mudah digerus menjadi serbuk. Cairan penyari yang digunakan air, etanol dan campuran air etanol (Andhidha, 2015)

Metode Ekstraksi

a. Cara Panas

1) Refluks

Refluks merupakan ekstraksi dengan pelarut pada temperature titik didihnya, selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Umumnya dilakukan pengulangan proses pada residu pertama sampai 3-5 kali sehingga dapat termasuk proses ekstraksi sempurna. (Maradona, 2013)

2) Soxletasi

Soxhletasi ialah ekstraksi dengan menggunakan pelarut yang selalu baru yang umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi kontinyu dengan jumlah pelarut relatif konstan dengan adanya pendinginan balik (Maradona, 2013)

b. Cara Dingin

1) Maserasi

Maserasi ialah proses pengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (kamar). Secara teknologi termasuk ekstraksi dengan prinsip metode pencapaian konsentrasi pada keseimbangan. Maserasi kinetik berarti dilakukan pengadukan yang kontinyu (terus-menerus). Remaserasi berarti dilakukan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama, dan seterusnya. Cara ini dapat menarik zat-zat berkhasiat yang tahan pemanasan maupun yang tidak tahan pemanasan. (Maradona, 2013)

2) Perkolasi

Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai sempurna (exhaustive extraction) yang umumnya dilakukan pada temperatur ruangan. Proses ini terdiri dari tahapan pengembangan bahan, tahap maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya (penetesan/penampungan ekstrak), terusmenerus sampai diperoleh ekstrak (perkolat) yang jumlahnya 1- 5 kali bahan. Ekstraksi ini membutuhkan pelarut yang lebih banyak. (Maradona, 2013)

2. Fraksinasi

Fraksinasi pada prinsipnya adalah proses penarikan senyawa pada suatu ekstrak dengan menggunakan dua macam pelarut yang tidak saling bercampur. Pelarut yang umum digunakan untuk fraksinasi adalah n-heksan,

etil asetat, dan metanol. Untuk menarik lemak dan senyawa nonpolar digunakan n-heksan, etil asetat untuk menarik senyawa semipolar, sedangkan metanol untuk menarik senyawa-senyawa polar. Dari proses ini dapat diduga sifat kepolaran dari senyawa yang akan dipisahkan. Sebagaimana diketahui bahwa senyawa-senyawa yang bersifat nonpolar akan larut dalam pelarut yang nonpolar, sedangkan senyawa-senyawa yang bersifat polar akan larut dalam pelarut yang bersifat polar juga (Armansyah, 2017)

E. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis (KLT) adalah salah satu cara untuk memisahkan suatu komponen berdasarkan adsorpsi dan partisi. Adsorben yang digunakan berupa bubuk halus dari silika gel yang dibuat serba rata di atas lempeng kaca. Ukuran partikel adsorben halus, agar lapisan adsorben pada lempeng kaca berbentuk rata dan homogen, sehingga rembesan dari cairan pengelusi cepat dan rata, dengan demikian komponen dapat terpisah baik. Perbandingan kecepatan Bergeraknya komponen terlarut dalam fase gerak adalah dasar untuk mengidentifikasi komponen yang dipisahkan, perbandingan kecepatan ini dinyatakan dalam R_f (Retardation of factor).

$$R_f = \frac{\text{jarak yang terbentuk oleh senyawa dari titik asal sampai noda}}{\text{jarak yang ditempuh oleh eluen dari titik asal sampai batas atas}}$$

Nilai R_f nilai dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor :

- a. Ukuran partikel dari adsorben
- b. Derajat keaktifan dari lapisan adsorben
- c. Kemurnian pelarut

- d. Konsentrasi pelarut
- e. Kejenuhan ruang elusi
- f. Temperatur
- g. Keterampilan bekerja dengan memakai KLT.

Pemisahan senyawa yang amat berbeda seperti senyawa organik alam, senyawa organik sintetik, kompleks anorganik-organik, dan bahkan ion organik, dapat dilakukan dalam beberapa menit dengan alat yang harganya tidak terlalu mahal. (Ibriani, 2012)

F. Uji Bioautografi

Bioautografi, berasal dari kata bio yang berarti makhluk hidup dan autografi berarti melakukan aktivitas sendiri. Bioautografi adalah suatu metode pendeteksian untuk menemukan suatu senyawa antimikroba yang belum teridentifikasi dengan cara melokalisasi aktivitas antimikroba tersebut pada suatu kromatogram. Metode ini memanfaatkan pengertian kromatografi lapis tipis (KLT). Pada bioautografi ini didasarkan atas efek biologi berupa antibakteri, antiprotozoa, antitumor, dan lain-lain dari substansi yang teliti. Ciri khas dari prosedur bioautografi adalah didasarkan pada metode difusi agar, dimana senyawa antimikrobanya dipindahkan dari lapisan KLT ke medium agar yang telah diinokulasikan dengan merata bakteri uji yang peka. Dari hasil inkubasi pada suhu dan waktu tertentu akan terlihat zona hambatan disekeliling dari spot dari KLT yang telah ditempelkan pada media agar. Zona hambat ditampakkan oleh aktivitas senyawa aktif yang terdapat didalam bahan yang diperiksa terhadap pertumbuhan mikroorganisme uji (Lukman, 2016)

KLT –Bioautografi dibagi menjadi 3 kelompok yaitu

1. Bioautografi Langsung

Prinsip kerja dari metode ini adalah suspensi mikroorganisme uji pekat dalam medium cair disemprotkan pada permukaan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) yang telah dihilangkan sisa-sisa eluen yang menempel pada lempeng kromatografi. Setelah itu dilakukan inkubasi pada suhu dan waktu tertentu.

2. Bioautografi Kontak

Metode ini didasarkan atas difusi dari senyawa yang telah dipisahkan dengan kromatografi lapis tipis (KLT) atau kromatografi kertas. Lempeng kromatografi tersebut ditempatkan diatas permukaan medium Nutrien Agar yang telah diinokulasikan dengan mikroorganisme yang sensitif terhadap senyawa antimikroba yang dianalisis. Setelah 15-30 menit, lempeng kromatografi tersebut dipindahkan diangkat dari permukaan medium. Senyawa antimikroba yang telah berdifusi dari lempeng kromatografi ke dalam media agar dan akan menghambat pertumbuhan bakteri setelah diinkubasi pada suhu dan waktu tertentu sampai noda yang menghambat pertumbuhan mikroorganisme uji tampak pada permukaan membentuk zona yang jernih.

3. Bioautografi Pencelupan

Pada prakteknya metode ini dilakukan sebagai berikut yaitu bahwa lempeng kromatografi yang telah dielusi, diletakkan dalam cawan petri, sehingga permukaannya tertutup oleh medium agar yang berfungsi sebagai “base layer” . setelah medium agar memadat, selanjutnya dituangkan medium

yang telah disuspensikan mikroba uji yang berfungsi sebagai “seed layer”.

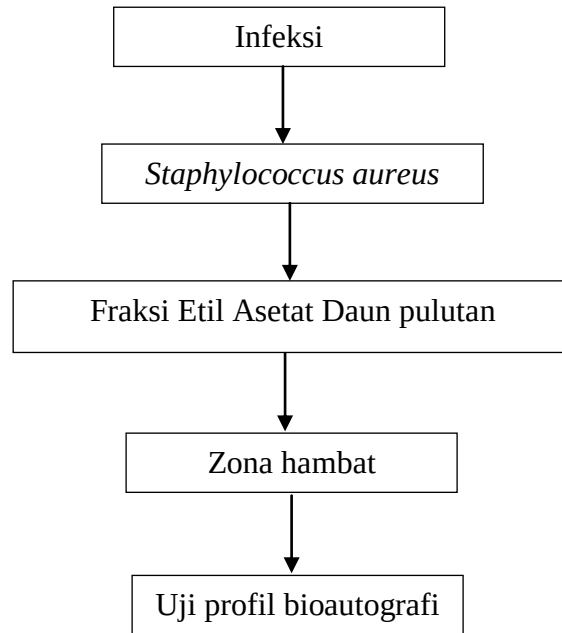
Kemudian diinkubasi pada suhu dan waktu sesuai.

G. Hipotesis

Fraaksi etil asetat daun pulutan (*Urena lobata* L) dapat menghambat bakteri

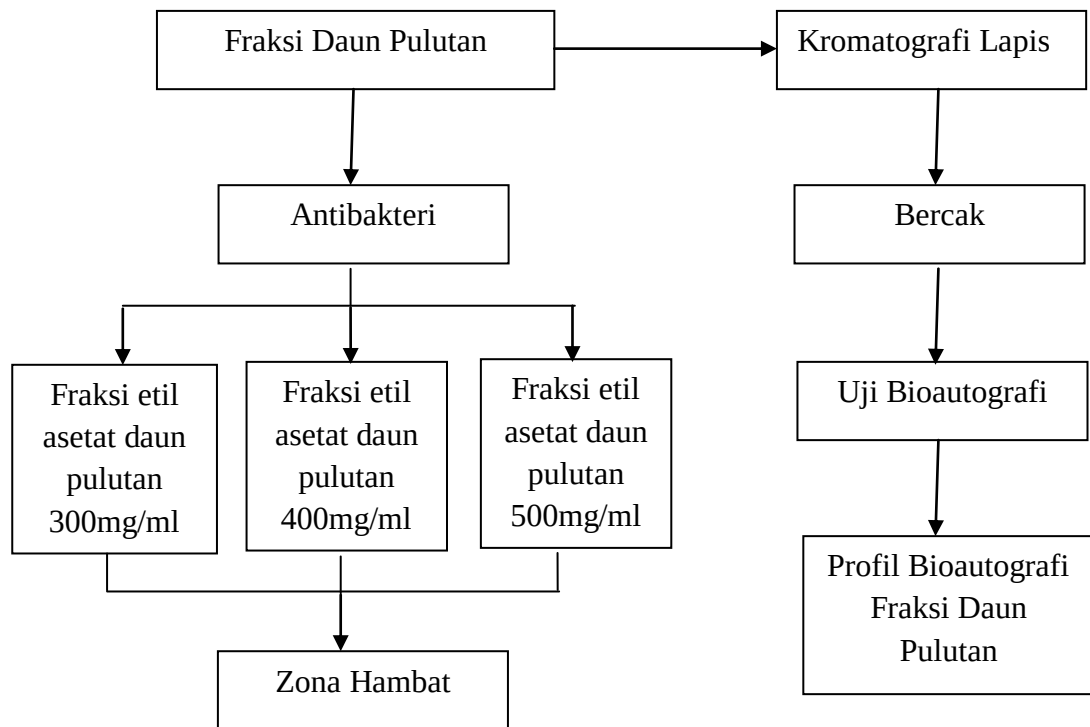
Staphylococcus aureus.

H. Kerangka Teori



Gambar 2. Kerangka Teori

I. Kerangka Konsep



Gambar 3. Kerangka Konsep

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Bahan dan Alat

1. Bahan

Adapun bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah, air suling, kertas perkamen, mikroba uji (*Staphylococcus aureus*), medium MHA (*Mueller Hinton Agar*), Cefadroxil, Etanol 70%, sampel fraksi etil asetat daun pulutan (*Urena lobata* L.), Etil asetat, N-Heksan, Reagen FeCl₃ 5%, Reagen Dragendorff dan Reagen Liebermann-Burchard, Aquades steril, Lempeng KLT 60 GF 254, NaCl 0.9%.

2. Alat

Adapun alat yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu autoklaf, bejana maserasi, cawan petri, *chamber*, Erlenmeyer 250 mL, gelas ukur 100 mL, gelas ukur 50 mL, *Laminar Air Flow* (LAF), cawan porselin, lemari pendingin, bunsin, oven, *water bath*, tabung reaksi, timbangan analitik.

B. Cara penelitian

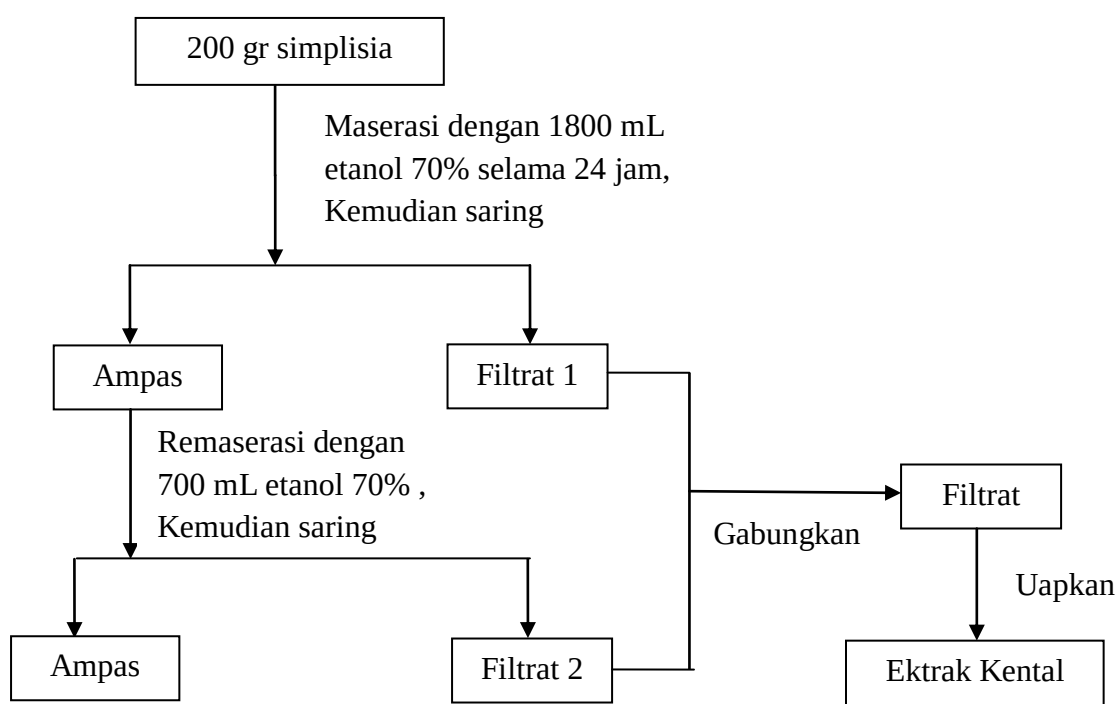
1. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan untuk membuktikan kebenaran pada penelitian. Identifikasi dilakukan di Universitas Ahmad Dahlan.

2. Ekstraksi

Sebanyak 200 gram serbuk simplisia daun sirsak dimasukkan kedalam bejana maserasi kemudian dilakukan maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 70% sampai serbuk simplisia terendam semua. Kemudian ditutup dan

didiamkan sambil sesekali diaduk. Proses maserasi dilakukan dengan mengganti pelarut tiap 1x24 jam selama tiga hari. Hasil maserasi dikumpulkan dan disaring. Filtratnya diuapka dengan *water bath* hingga diperoleh ekstrak kental, kemudian disimpan dalam wadah kaca yang dilapisi aluminium foil. (Fitriani, 2014)

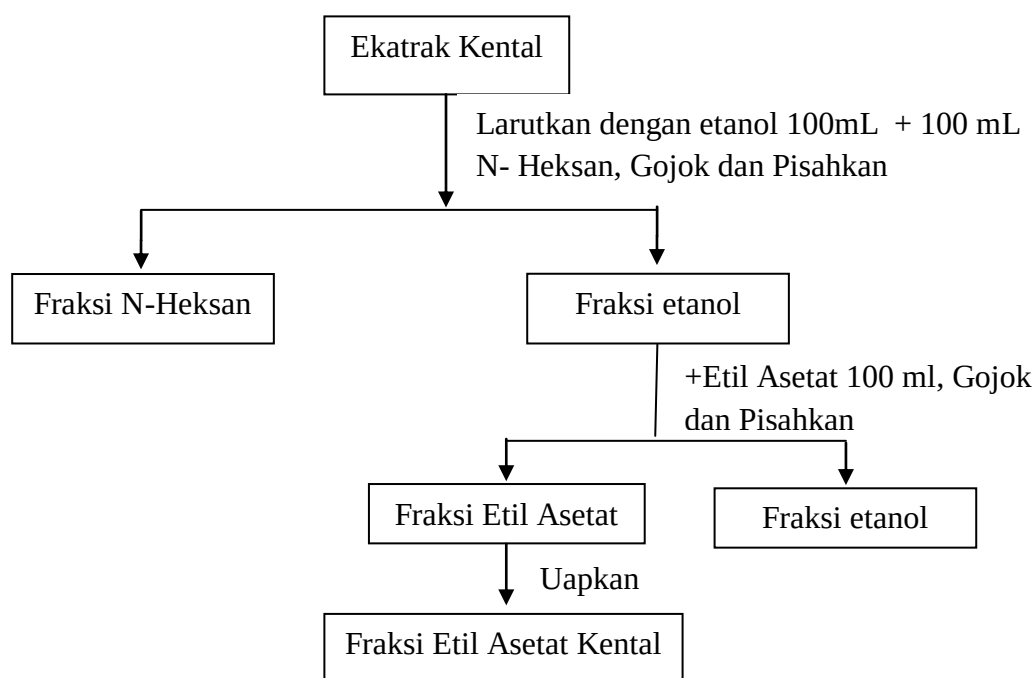


Gambar 4. Ekstraksi

3. Fraksinasi

Fraksinasi dilakukan dengan metode cair – cair, Ektrak kental yang diperoleh selanjutnya difraksinasi dengan menggunakan 3 pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda-beda, yaitu n- heksan, etil asetat, dan Etanol. Proses fraksinasi dilakukan dengan melarutkan sampel sebanyak 10 g ekstrak kental dengan etanol sebanyak 100 ml di aduk hingga homogen dan ditambahkan pelarut n-heksan sebanyak 100 ml selanjutnya dimasukkan ke

dalam corong pisah dikocok hingga terpisah 2 lapisan, lapisan atas merupakan fase n- heksan dan lapisan bawah merupakan fase metanol. Fase n-heksan dipisahkan dan fase metanol difraksinasi kembali dengan pelarut etil asetat. Fase etil asetat yang telah terkumpul dipekatkan menggunakan water bath(Paputungan *et al.*, 2019).



Gambar 5. Fraksinasi

4. Uji Aktivitas Antibakteri

a. Sterilisasi alat dan pembuatan media

1) Sterilisasi Alat

Alat-alat gelas yang digunakan dalam penelitian ini disterilkan terlebih dahulu dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Pinset, dan jarum ose dipijarkan diatas api bunsen dan media disterilkan di autoklaf pada suhu 121°C

2) Pembuatan media MHA (*Mueller Hinton Agar*)

Ditimbang sebanyak 3,8 g MHA kemudian dilarutkan dengan aquades sampai 100 mL, diaduk sampai homogen. Media yang telah homogen kemudian disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan dibiarkan media sampai cukup dingin. Selanjutnya media MHA yang masih cair dituang ke dalam cawan petri dibiarkan hingga memadat.

3) Pembuatan media agar miring

Pembuatan agar miring dilakukan dengan memasukkan 10 mL media yang telah disterilkan dalam tabung reaksi kemudian disumbat dengan kapas steril dan dimiringkan sekitar 45°. Diidamkan hingga memadat pada suhu ruangan. Media agar miring digunakan sebagai peremajaan bakteri.

b. Pembuatan suspensi bakteri

1) Pembuatan Larutan Mc. Farland standart 0,5 (10^8 CFU)

Larutan BaCl_2 1,175% b/v 0,5 ml dicampurkan dengan Larutan H_2SO_4 1% v/v 99,5 ml dalam tabung reaksi steril, dikocok sampai homogen dan ditutup. Apabila kekeruhan hasil suspensi bakteri sama dengan kekeruhan suspensi standar berarti konsentrasi bakteri 10^8 CFU/ml.

2) Pembuatan suspensi bakteri

Bakteri uji yaitu *Staphylococcus aureus* yang telah diinkubasi kemudian diambil 1 ose, kemudian disuspensikan ke dalam tabung reaksi yang

berisi 10 ml larutan NaCl 0,9ml dan dibandingkan kekeruhannya dengan Larutan Mc. Farland standart 0,5 (10^8 CFU)

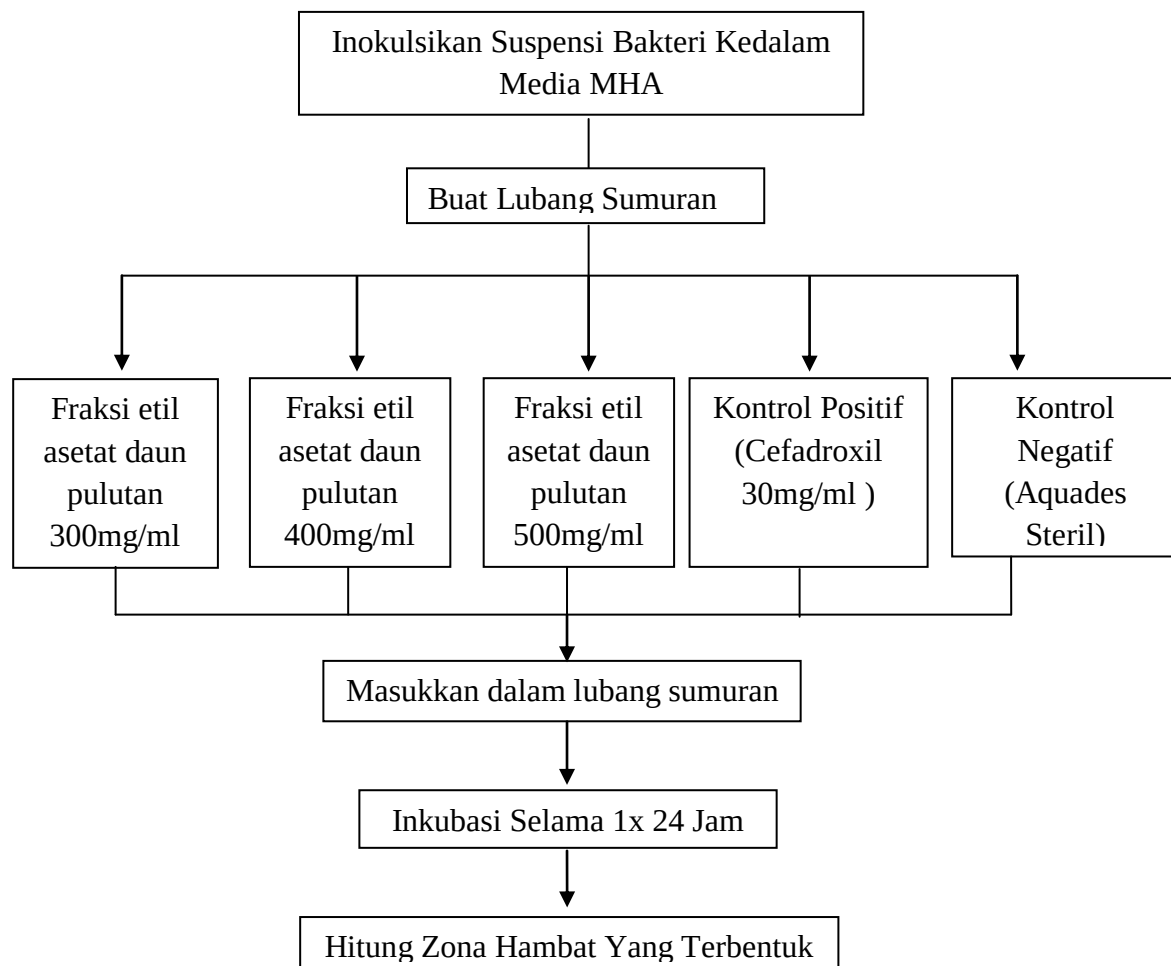
c. Pembuatan Larutan Uji

Dan dibuat larutan uji dengan konsentrasi 300 mg/ml, 400 mg/ml, dan 500 mg/ml.

d. Pengujian Aktivitas Antibakteri

Pada penelitian ini digunakan pengujian aktivitas antibakteri dengan metode sumuran, dengan Cefadroxil 30 mg/mL sebagai kontrol positif dan aquades steril sebagai kontrol negatif.

Stok media yang telah disterilkan dimasukkan dalam cawan petri, setelah media mengeras, suspensi bakteri diinokulasika kedalam media dengan cara mengambil *cotton bud* yang telah disterilkan kemudian masukkan kedalam tabung reaksi yang berisi suspensi bakteri, kemudian *cotton bud* diusapkan keseluruh permukaan media pada cawan petri secara merata. Kemudian dibuat sumuran dengan diameter 6mm, masing- masing cawan petri dibuat 5 lubang sumuran, Sampel yang telah ditentukan konsentrasinya 300 mg/ml, 400 mg/ml, dan 500 mg/ml, kontrol positif (cefadroxil 30mg/ml) dan kontrol negatif (Aquades steril) selanjutnya dimasukkan kedalam lubang sumuran. Masing-masing cawan petri diberi label sesuai dengan komponen pengujian kemudian diinkubasi selama 1 x 24 jam dan amati zona hambat yang terbentuk.



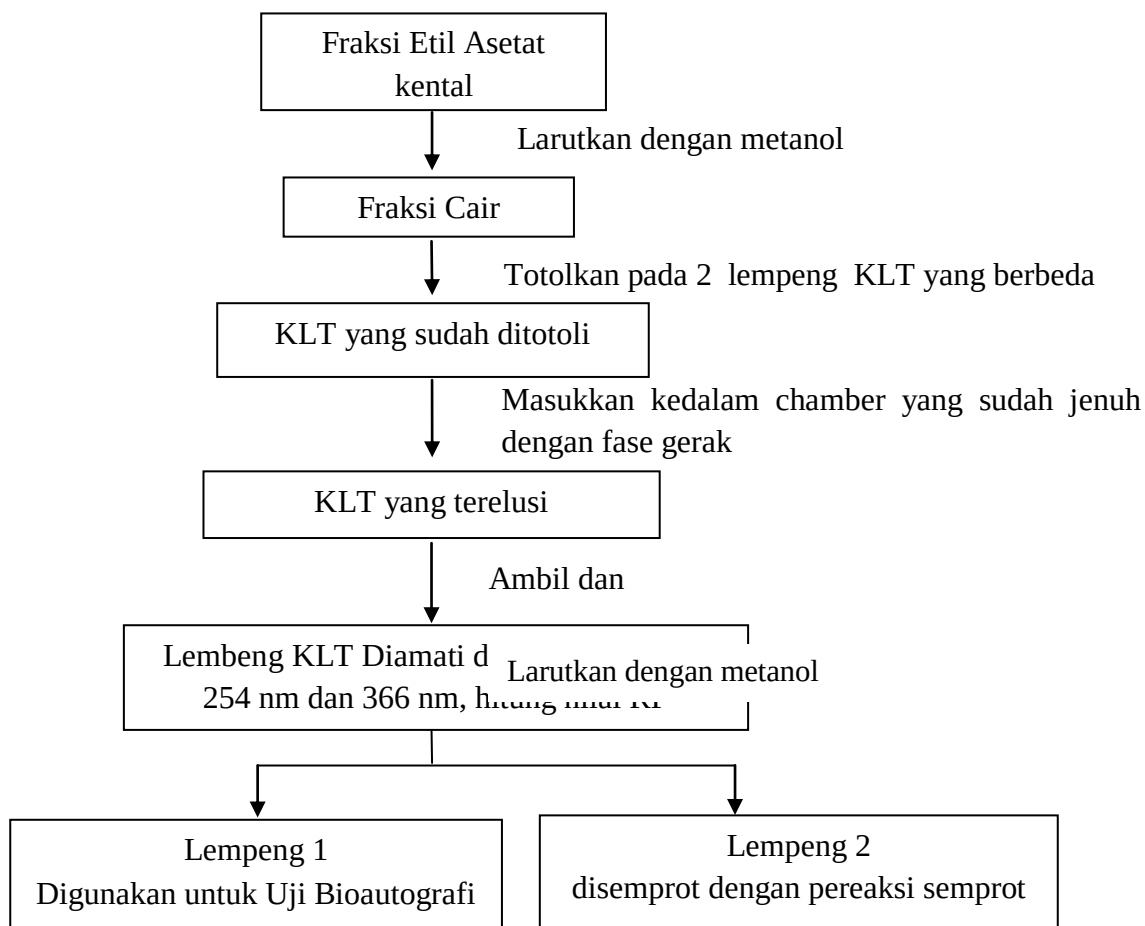
Gambar 6. Uji Antibakteri

5. Uji KLT (Kromatografi Lapis Tipis)

Digunakan silica gel yang diberi tanda tepi atas dan bawah dengan jarak 1 cm, selanjutnya plat diaktifkan dengan cara dipanaskan pada suhu 105°C selama 10 menit. Fase gerak yang digunakan adalah methanol : air (6 : 4). Fase gerak dimasukkan kedalam chamber kemudian dijenuhkan terlebih dahulu menggunakan kertas saring.

Fraksi etil asetat dilarutkan dalam Etanol dengan konsentrasi 90%. Larutan tersebut selanjutnya ditotolkan pada plat KLT dan dielusi dengan fase gerak

hasil optimasi yaitu methanol : air (6 : 4). selanjutnya diamati dengan lampu UV 254nm dan 366nm, dan hitung nilai RF bercak dan semprot dengan pereaksi semprot. (Yulianti, 2013)

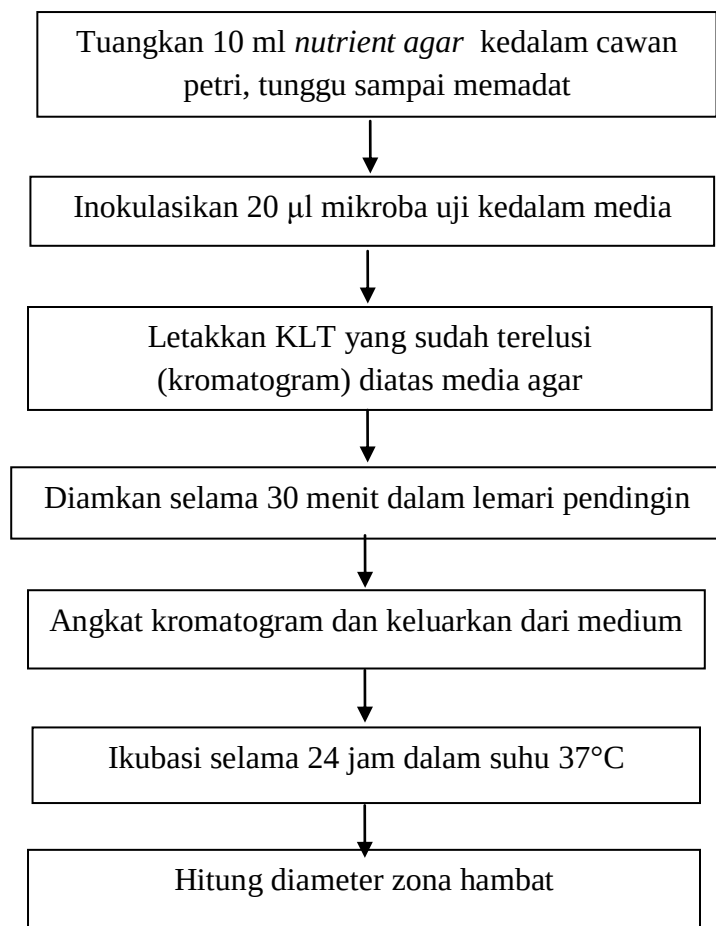


Gambar 7. Uji KLT

6. Bioautografi

Sebanyak 10 ml medium *nutrient agar* dituangkan ke dalam cawan petri secara aseptis dan dibiarkan sampai media memadat kemudian sebanyak 20 µl mikroba uji diinokulasi ke dalam media. Kromatogram hasil pemisahan senyawa secara KLT kemudian diletakkan di atas permukaan medium yang memadat. Didiamkan selama 30 menit dilemari pendingin, kemudian lempeng

(kromatogram) diangkat dan dikeluarkan dari medium. Selanjutnya diinkubasi selama 1 x 24 jam pada suhu 37°C diamati hasilnya.



Gambar 8. Uji Bioautografi

7. Identifikasi Golongan Senyawa dengan Beberapa Penampakan Bercak

Kromatogram disemprot dengan menggunakan pereaksi semprot sebagai berikut:

a. Alkaloid

Pereaksi yang digunakan Dragendorff. Dengan pereaksi Dragendorff akan dihasilkan warna jingga dengan latar belakang kuning untuk senyawa golongan alkaloid.

b. Steroid

Pereaksi yang digunakan Liebermann-Burchard. Kromatogram terlebih dahulu dipanaskan, kemudian diamati di lampu UV 366 nm, munculnya noda berfluoresensi coklat atau biru menunjukkan adanya triterpen, sedangkan munculnya warna hijau kebiruan menunjukkan adanya steroid.

c. Flavonoid

Pereaksi yang digunakan AlCl_3 (Aluminium Klorida) 5% diamati di lampu UV 366 nm, akan dihasilkan noda berfluoresensi hijau untuk senyawa golongan flavanoid

d. Tanin

Pereaksi yang digunakan FeCl_3 (Besi III Klorida) 5%, jika sampel mengandung senyawa tanin maka akan dihasilkan warna hitam.

C. Analisis hasil

Data yang terdistribusi normal dan bervarian homogen dianalisis secara statistik parametrik menggunakan ANOVA. Data yang tidak terdistribusi normal dan tidak bervarian homogen dianalisis secara statistik non parametrik menggunakan uji Kruskal Wallis. Homogenitas dan normalitas data diuji dengan Kolmogorov-Smirnov. Pengolahan data dilakukan dengan SPSS Statistics(Yasir et al., 2017)

D. Jadwal Penelitian

Penelitian ini dilakukan di universitas muhammadiyah magelang mulai bulan Agustus 2020 – Desember 2021.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa :

- 1 Terdapat aktivitas antibakteri fraksi Etil asetat terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dalam konsentrasi 300 mg/nl, 400 mg/ml dan 500 mg/ml.
- 2 Hasil uji KLT-Bioautografi dari fraksi etil asetat terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* tidak memperlihatkan adanya noda yang aktif.

B. Saran

- 1 Penelitian ini memerlukan penelitian lanjutan mengenai aktivitas antibakteri dari fraksi N-Heksan dan fraksi Etanol daun Pulutan
- 2 Perlunya menggunakan eluen lain untuk identifikasi senyawa yang ada pada fraksi etil asetat daun pulutan

DAFTAR PUSTAKA

- Amrie, A. G. Al. (2014). *UJI EFEKTIFITAS EKSTRAK DAUN DAN AKAR Harrisonia perforata MERR. TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI Vibrio cholerae "EFFECTIVITY*. 3(December), 331–340.
- Andhidha, karimah yulianti. (2015). *UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK DAUN Garcinia benthami Pierre TERHADAP BEBERAPA BAKTERI PATOGEN DENGAN METODE BIOAUTOGRAFI*.
- Aniq, A. (2015). *SISTEM PAKAR UNTUK MENDIAGNOSIS PENYAKIT INFEKSI MENGGUNAKAN FORWARD CHAINING*. 4(1), 43–47.
- Armansyah. (2017). *UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI HASIL FRAKSINASI EKSTRAK ETANOL 96% DAUN NANGKA (Artocarpus heterophyllus Lamk.) TERHADAP BAKTERI PENYEBAB JERAWAT Skripsi*.
- Babu, S. S., Madhuri, D. B., & Ali, S. L. (2016). *A PHARMACOLOGICAL REVIEW OF URENA LOBATA PLANT*. 9(2), 1–3.
- Badrunasar, A., & Santoso, harry budi. (2017). *Tumbuhan Liar Berkhasiat Obat*.
- Brahmana, E. M. (2015). *SINTESIS DAN UJI ANTIBAKTERI SENYAWA (E)-1-(2-KLOROFENIL)-3-P-TOLILPROP-2-EN-1-ON*. 4(2), 103–108.
- Febrianasari, F. (2018). *UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK DAUN KIRINYU (Chromolaena odorata) TERHADAP Staphylococcus aureus*.
- Fitriani, E. (2014). *UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL DAUN SIRSAK (Annona muricata L.) TERHADAP Shigella flexneri SECARA IN VITRO*.
- Ibriani. (2012). *UJI AKTIVITAS ANTIMIKROBA EKSTRAK BAWANG MERAH (Allium cepa L.) SECARA KLT-BIOAUTOGRAFI*.
- Kusumaningtyas, E. (2008). *Sensitifitas Metode bioautografi kontak dan agar overlay dalam Penentuan Seyawa Antikapang*. 6, 2.
- Lukman, A. (2016). *UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK DAUN KEMANGI (Ocimum sanctum L) TERHADAP BAKTERI PATOGEN DENGAN METODE KLT BIOAUTOGRAFI*.
- Maisaroh, S. dkk. (2015). *PENGARUH REBUSAN SIMPLISIA DAUN PULUTAN (Urena lobata L.) TERHADAP NEKROSIS SEL TUBULUS KONTORTUS*

PROKSIMAL GINJAL MENCIT (Mus musculus) GALUR Balb C.

- Mane., S. (2016). *EXPLORING THE PHARMACOGNOSTIC CHARACTERISTICS AND ANTIMICROBIAL POTENTIAL*. 7(11), 31–37. <https://doi.org/10.7897/2230-8407.0711124>
- Maradona, D. (2013). *Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Durian (Durio zibethinus L), Daun Lengkek (Dimocarpus longan Lour), Dan Daun Rambutan (Nephelium lappaceum L) Terhadap Bakteri Staphylococcus aureus ATCC 25925 dan Escherichia coli ATCC 25922*.
- Mpila, debi A. (2012). *UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL DAUN MAYANA (Coleus atropurpureus [L] Benth) TERHADAP Staphylococcus aureus, Escherichia coli DAN Pseudomonas aeruginosa SECARA IN-VITRO*. 13–21.
- Paputungan, W. A., Lolo, W. A., & Siampa, J. P. (2019). *AKTIVITAS ANTIBAKTERI DAN ANALISIS KLT-BIOAUTOGRAFI DARI FRAKSI BIJI KOPI ROBUSTA (Coffea canephora Pierre ex A . Froehner).* 8(3), 100–108.
- Pratiwi, L., & Dkk. (2016). *Ethanol Extract , Ethyl Acetate Extract , Ethyl Acetate Fraction , and n-Heksan Fraction Mangosteen Peels (Garcinia mangostana L .) As Source of Bioactive Substance Free-Radical Scavengers Ekstrak etanol , Ekstrak etil asetat , Fraksi etil asetat , dan F.* 71–82.
- PRATIWI, M. N. (2019). *AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI BUAH JAMBU WER (Prunus persica (L.) Batsch) TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI Staphylococcus aureus*.
- Prayoga, E. K. O., Studi, P., Dokter, P., Kedokteran, F., Ilmu, D. A. N., Islam, U., & Syarif, N. (2013). *PERBANDINGAN EFEK EKSTRAK DAUN SIRIH HIJAU (Piper betle L .) DENGAN METODE DIFUSI DISK DAN SUMURAN TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI Staphylococcus aureus*.
- Sani, R. N. (2014). *ANALISIS RENDEMEN DAN SKRINING FITOKIMIA EKSTRAK ETANOL MIKROALGA LAUT Tetraselmis chuii Yield Analysis and Phytochemical Screening Ethanol Extract of Marine Microalgae Tetraselmis chuii*. 2(2), 121–126.
- Ulfa, E. U. (2013). *Aktivitas antibakteri dan klt bioautografi ekstrak etanol daun*

sisik naga (Drymoglossum piloselloides) TERHADAP Streptococcus mutans. (Iii), 39–43.

Usman, S. (2019). *Pengaruh Metode Ekstraksi Terhadap Rendemen Dan Kadar Fenolik Ekstrak Tanaman Kayu Beta-Beta (Lunasia amara Blanco) (The Effect of Extraction Method on Yield Value and Phenolic Content of Beta-Beta.* 5(2), 175–182. <https://doi.org/10.22487/j24428744.2019.v5.i2.13149>

Wulandari, R., Utami, pri iswati, & Hartanti, D. (2009). *PENAPISAN FITOKIMIA DAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL HERBA PULUTAN (Urena lobata Linn.).* 06(01), 1–9.

Yang, Y., Huang, A., & Zou, X. (2017). *THE ANTIBACTERIAL EFFECT OF URENA LOBATA L. FROMV GUANGXI ON MICE WITH STAPHYLOCOCCUS AUREUS PNEUMONIA.* 14, 73–88. <https://doi.org/10.21010/ajtcam.v14i1.9>

Yasir, Y., Mulawarman, U., Yuniati, Y., Paramita, S., Mulawarman, U., Zubaidah, M., & Mulawarman, U. (2017). *ANALISIS BIOAUTOGRAFI DENGAN KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS PADA EKSTRAK ETANOL DAUN Caesalpinia sumatrana ROXB. TERHADAP BAKTERI PENYEBAB INFEKSI NOSOKOMIAL* Yadi. (June). <https://doi.org/10.25026/jsk.v1i7.57>

Yulianti, nur fatdliyah eka. (2013). *Aktivitas Antibakteri dan Bioautografi Fraksi Etil Asetat Ekstrak Aseton Kulit Buah Kakao (Theobroma cacao L.) Terhadap Streptococcus mutans dan Bacillus subtilis.*