

**AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI ETIL ASETAT DARI
EKSTRAK ETANOL DAUN JOHAR (*Cassia siamea* Lamk) DAN
IDENTIFIKASI GOLONGAN SENYAWA AKTIF**

SKRIPSI



oleh:

Aprilia Setya Ningrum

165010008

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS WAHID HASYIM
SEMARANG
Maret 2021**

**AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI ETIL ASETAT DARI
EKSTRAK ETANOL DAUN JOHAR (*Cassia siamea* Lamk) DAN
IDENTIFIKASI GOLONGAN SENYAWA AKTIF**

SKRIPSI

**Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat
dalam mencapai derajat Sarjana Farmasi
Program Studi Ilmu Farmasi pada Fakultas Farmasi
Universitas Wahid Hasyim**

oleh:

Aprilia Setya Ningrum

165010008

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS WAHID HASYIM
SEMARANG
Maret 2021**

INTISARI

AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI ETIL ASETAT DARI EKSTRAK ETANOL DAUN JOHAR (*Cassia siamea* Lamk) DAN IDENTIFIKASI GOLONGAN SENYAWA AKTIF

Daun johar mengandung senyawa metabolit sekunder yaitu alkaloid, steroid, triterpenoid, saponin, flavonoid, dan tanin yang diduga berpotensi sebagai antibakteri. Fraksi etil asetat secara umum dapat menyari senyawa flavonoid, alkaloid, triterpenoid, steroid, polifenol dan antrakuinon. *Bacillus subtilis* dan *Staphylococcus epidermidis* adalah bakteri gram positif yang memiliki karakteristik pertahanan yang berbeda. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antibakteri fraksi etil asetat ekstrak etanol daun johar (FEAEDJ) terhadap bakteri *Bacillus subtilis* dan *Staphylococcus epidermidis* serta identifikasi golongan senyawa aktif.

Serbuk daun johar (*Cassia siamea* Lamk.) diekstraksi menggunakan pelarut etanol 96% dengan metode perkolasi, kemudian dilakukan fraksinasi bertingkat menggunakan pelarut n-heksan, etil asetat, air. FEAEDJ diuji aktivitas antibakteri dengan metode disk difusi terhadap bakteri *Bacillus subtilis* dan *Staphylococcus epidermidis*. Uji pendahuluan berupa skrining fitokimia dilakukan sebelum uji KLT. Uji KLT dilakukan terhadap senyawa flavonoid dan polifenol menggunakan fase gerak Kloroform : Aseton : Asam formiat (7,5 : 1,9 : 0,6). Penampak bercak senyawa flavonoid adalah uap amonia dan senyawa polifenol adalah FeCl_3 .

Hasil uji aktivitas antibakteri FEAEDJ memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Bacillus subtilis* pada konsentrasi 500 $\mu\text{g}/\text{disk}$, 1.000 $\mu\text{g}/\text{disk}$, 1.500 $\mu\text{g}/\text{disk}$, 2.000 $\mu\text{g}/\text{disk}$, dan 2.500 $\mu\text{g}/\text{disk}$ sedangkan pada bakteri *Staphylococcus epidermidis* pada konsentrasi 3.000 $\mu\text{g}/\text{disk}$, 4.000 $\mu\text{g}/\text{disk}$, dan 5.000 $\mu\text{g}/\text{disk}$. Hasil uji KLT menunjukkan FEAEDJ mengandung senyawa flavonoid dan polifenol.

Kata kunci: Antibakteri, fraksi etil asetat, daun johar (*Cassia siamea* Lamk.), KLT

ABSTRACT

ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF ETHYL ACETATE FRACTION FROM ETHANOL EXTRACT OF JOHAR LEAVES (*Cassia siamea* Lamk) AND PHYTOCHEMICAL SCREENING BY TLC

Johar leaves contain secondary metabolites, namely alkaloids, steroids, triterpenoids, saponins, flavonoids, and tannins which are thought to have antibacterial potential. Generally, the ethyl acetate fraction can extract flavonoids, alkaloids, triterpenoids, steroids, polyphenols, and anthraquinones. Bacillus subtilis and Staphylococcus epidermidis are gram-positive bacteria that have different defense characteristics. The aim of this study was to determine the antibacterial activity of the ethyl acetate fraction of johar leaf ethanol extract (FEAEDJ) against Bacillus subtilis and Staphylococcus epidermidis and to identify groups of active compounds.

*Johar leaf powder (*Cassia siamea* Lamk.) Was extracted using 96% ethanol solvent by percolation method, then graded fractionation was carried out using n-hexane, ethyl acetate, and water as a solvent. FEAEDJ was tested for antibacterial activity by diffusion disk method against Bacillus subtilis and Staphylococcus epidermidis. A preliminary test in the form of a phytochemical screening was carried out before the TLC test. The TLC test was carried out on flavonoids and polyphenols using the mobile phase of Chloroform: Acetone: Formic acid (7.5: 1,9: 0.6). The appearance of flavonoid compound spots is ammonia vapor and polyphenol compounds are FeCl₃.*

The results of the FEAEDJ antibacterial activity test had antibacterial activity against Bacillus subtilis at concentrations of 500 µg / disk, 1,000 µg / disk, 1,500 µg / disk, 2,000 µg / disk, and 2,500 µg / disk, whereas in Staphylococcus epidermidis bacteria at a concentration of 3,000 µg / disk, 4,000 µg / disk, and 5,000 µg / disk. TLC test results show that FEAEDJ contains flavonoids and polyphenols.

*Keywords: Antibacterial, ethyl acetate fraction, johar leaves (*Cassia siamea* Lamk.), TLC*

PENGESAHAN SKRIPSI

Berjudul

**AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI ETIL ASETAT DARI
EKSTRAK ETANOL DAUN JOHAR (*Cassia siamea* Lamk) DAN
IDENTIFIKASI GOLONGAN SENYAWA AKTIF**

oleh:

Aprilia Setya Ningrum
165010008

**Dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim
Pada tanggal: 1 Maret 2021**

Pembimbing,

(apt. Dewi Andini Kunti Mulangsi, M.Farm.)

Mengetahui:

Fakultas Farmasi

Universitas Wahid Hasyim

Dekan,

(Dr. apt. Maulana Cut Nuris, M.Sc.)

SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Aprilia Setya Ningrum

NIM : 165010008

Judul Skripsi : Aktivitas Antibakteri Fraksi Etil Asetat Dari Ekstrak Etanol Daun Johar (*Cassia siamea* Lamk.) dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif

Dengan ini menyatakan bahwa dalam skripsi saya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah skripsi saya dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Demikian surat pernyataan ini dibuat untuk dapat digunakan sebagaimana mestinya.

Semarang, Maret 2021



Aprilia Setya Ningrum

“ Sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan. Maka apabila engkau telah selesai (dari sesuatu urusan), tetaplah bekerja keras (untuk urusan yang lain), dan hanya kepada Tuhanmulah engkau berharap” (Q.S. Al-Insyirah ; 6-8)

Kupersembahkan untuk:

Kedua orang tua sebagai wujud hormat dan baktiku

Kakakku sebagai wujud terima kasih dan baktiku

Almamater sebagai wujud terima kasih dan khidmahku

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas rahmat, berkat dan hidayahnya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul “Aktivitas Antibakteri Fraksi Etil Asetat dari Ekstrak Etanol Daun Johar (*Cassia siamea* Lamk.) dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif” sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Sarjana Farmasi di Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim Semarang.

Tersusunnya skripsi ini tidak lepas dari bantuan dan dukungan berbagai pihak. Banyak rintangan yang dihadapi penulis untuk dapat menyelesaikan skripsi ini. Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih yang amat dalam atas bantuan yang diberikan baik moril maupun materiil kepada :

1. Ibu Dr. apt. Maulita Cut Nuria, M.Sc selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim Semarang
2. Ibu apt. Dewi Andini Dewi Kunti Mulangsri, M.Farm. selaku dosen pembimbing yang telah memberikan pengarahan, dukungan serta meluangkan waktu dan pemikirannya untuk membimbing penulis dalam menyelesaikan skripsi ini
3. Ibu apt. Ririn Lispita W., M. Si. Med. dan Ibu apt. Kiki Damayanti, M. Farm. selaku dosen penguji yang telah memberikan koreksi saran dan masukan kepada penulis

4. Seluruh Dosen di Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim Semarang yang telah memberikan bekal ilmu pengetahuan sebagai dasar penyusunan skripsi ini
5. Pimpinan dan Staff Laboratorium Fitokimia dan Mikrobiologi Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim Semarang yang telah memberikan izin dan membantu dalam pelaksanaan penelitian ini
6. Pihak-pihak lain yang telah membantu dalam penelitian yang tidak bisa saya sebutkan satu-satu

Penulis menyadari banyak kekurangan dalam penulisan skripsi ini, oleh karena itu penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun. Semoga penelitian ini dapat memberikan informasi yang bermanfaat khususnya dibidang farmasi.

Semarang, Maret 2021

Penulis



Aprilia Setya Ningrum

DAFTAR ISI

INTISARI.....	ii
<i>ABSTRACT</i>	iii
SURAT PERNYATAAN.....	v
KATA PENGANTAR	viii
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Rumusan Masalah.....	3
C. Tujuan Penelitian	3
D. Manfaat Penelitian.....	4
E. Tinjauan Pustaka	4
1. Tanaman Johar (<i>Cassia siamea</i> Lamk)	4
2. Ekstraksi	6
3. Fraksinasi.....	7
4. Tinjauan Mikrobiologi	8
5. Uji Aktivitas Antibakteri	11
6. Kromatografi Lapis Tipis	12
F. Landasan Teori.....	14
G. Hipotesis.....	15
BAB II. METODE PENELITIAN	16
A. Bahan dan Alat yang Digunakan	16
1. Bahan	16
2. Alat	16
B. Jalannya Penelitian	17
1. Determinasi tanaman	17
2. Pembuatan serbuk daun johar.....	17

3.	Pembuatan ekstrak etanol daun johar	17
4.	Pembuatan fraksi etil asetat dari ekstrak etanol daun johar	18
5.	Sterilisasi untuk uji aktivitas antibakteri	19
6.	Pembuatan media	19
c.	Media mueller hilton agar (MHA)	20
7.	Peremajaan kultur bakteri.....	20
8.	Pembuatan suspensi bakteri.....	20
b.	Bakteri <i>Bacillus subtilis</i>	20
9.	Pembuatan larutan standar Mc Farland	21
10.	Pembuatan larutan uji fraksi etil asetat ekstrak etanol daun johar	21
11.	Uji aktivitas antibakteri <i>Staphylococcus epidermidis</i>	22
12.	Uji aktivitas antibakteri <i>Bacillus subtilis</i>	22
13.	Identifikasi golongan senyawa secara kromatografi lapis tipis.....	23
C.	Analisis Data	24
BAB III. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN		27
A.	Determinasi Tanaman Johar	27
B.	Pembuatan Serbuk Daun Johar.....	27
C.	Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Johar	28
D.	Pembuatan Fraksi Etil Asetat Dari Ekstrak Etanol Daun Johar.....	28
E.	Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanol Daun Johar.....	28
F.	Identifikasi Golongan Senyawa Secara Kromatografi Lapis Tipis.....	32
BAB IV. KESIMPULAN DAN SARAN		39
A.	Kesimpulan.....	39
B.	Saran	40
DAFTAR PUSTAKA		41
LAMPIRAN.....		46

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Diameter daerah hambat (DDH) fraksi etil asetat ekstrak etanol daun johar terhadap bakteri <i>Bacillus subtilis</i>	29
Tabel 2. Diameter daerah hambat (DDH) fraksi etil asetat ekstrak etanol daun johar terhadap bakteri <i>Staphylococcus epidermidis</i>	30
Tabel 3. Hasil uji skrining fitokimia fraksi etil asetat ekstrak etanol daun johar..	32

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Tanaman johar (<i>Cassia siamea</i> Lamk.).	5
Gambar 2. Tampilan mikroskopis sel <i>Staphylococcus epidermidis</i>	9
Gambar 3. Tampilan mikroskopis sel <i>Bacillus subtilis</i>	10
Gambar 4. Identifikasi senyawa flavonoid secara KLT setelah di uap amonia. ...	37
Gambar 5. Identifikasi senyawa polifenol secara KLT.....	38

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Determinasi Tanaman.....	47
Lampiran 2. Perhitungan rendemen	48
Lampiran 3. Perhitungan Konsentrasi Larutan Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Etil Asetat Dari Ekstrak Etanol Daun Johar Terhadap Bakteri <i>Bacillus subtilis</i>	49
Lampiran 4. Perhitungan Konsentrasi Larutan Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Etil Asetat Dari Ekstrak Etanol Daun Johar Terhadap Bakteri <i>Staphylococcus epidermidis</i>	51
Lampiran 5. Hasil uji antibakteri fraksi etil asetat ekstrak etanol daun johar terhadap bakteri <i>Bacillus subtilis</i>	52
Lampiran 6. Uji aktivitas antibakteri fraksi etil asetat ekstrak etanol daun johar terhadap bakteri <i>Staphylococcus epidermidis</i>	53
Lampiran 7. Hasil skrining fitokimia uji tabung	54
Lampiran 8. Dokumentasi penelitian	57

BAB I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Indonesia merupakan salah satu negara *megadiversity* yang memiliki keanekaragaman hayati melimpah. Keanekaragaman hayati merupakan sumber biomolekul senyawa-senyawa organik yang tidak terbatas jumlahnya. Berbagai tumbuhan di Indonesia dapat digunakan sebagai tanaman obat tradisional, tetapi baru sebagian kecil yang diteliti lebih lanjut. Tanaman dapat digunakan sebagai obat tradisional dikarenakan adanya kandungan senyawa aktif yang terkandung dalam tanaman tersebut (Indriyanto, 2006). Senyawa-senyawa tersebut merupakan golongan senyawa metabolit sekunder. Golongan senyawa metabolit sekunder itu berupa alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, steroid dan triterpenoid (Kemenkes RI, 1989). Metabolit sekunder dapat digunakan sebagai *lead compounds* dalam penemuan dan pengembangan obat baru (Atun, 2014). Senyawa metabolit sekunder memiliki aktivitas biologis salah satunya sebagai antibakteri (Yuhernita dan Juniarti, 2011).

Tanaman johar (*Cassia siamea* Lamk.) adalah salah satu tanaman di Indonesia yang banyak digunakan dalam pengobatan tradisional. Daun johar banyak digunakan dalam pengobatan tradisional sebagai obat antimalaria, kencing manis, luka, demam, gatal dan kudis (Hyene, 1987). Daun johar mengandung senyawa metabolit sekunder alkaloid, steroid, triterpenoid, saponin, flavonoid, dan tanin (Kemenkes RI, 1989). Berdasarkan hasil uji skrining fitokimia dengan uji tabung ekstrak etanol daun johar mengandung senyawa alkaloid, flavonoid,

saponin, dan tanin. Ekstrak etil asetat daun johar mengandung senyawa alkaloid, tanin, dan steroid (Fitriah dkk., 2017). Ekstrak etanol dan ekstrak etil asetat daun johar terbukti memiliki potensi antibakteri terhadap bakteri Gram positif yaitu *S. aureus* dan *M. luteus* sedangkan bakteri Gram negatif yaitu *E. coli* dan *S. dysenteriae*. (Fitriah dkk., 2017). Penelitian yang dilakukan oleh Dahiru dkk (2013) menyebutkan bahwa fraksi etil asetat dari ekstrak etanol daun johar memiliki potensi penghambatan pertumbuhan terhadap bakteri *Eschericia coli*, *Salmonella thypi*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Klabisella pneumonia*.

Fraksinasi dilakukan untuk memisahkan senyawa-senyawa berdasarkan tingkat kepolaran dan menyederhanakan senyawa dalam ekstrak. Pelarut yang digunakan untuk fraksinasi yaitu n-heksan, etil asetat dan air. Fraksinasi dilakukan karena dari penelitian yang telah dilakukan sebelumnya fraksi etil asetat dari ekstrak etanol daun johar memiliki aktivitas antibakteri dan senyawa yang terkandung dalam fraksi etil asetat umumnya yaitu senyawa flavonoid, alkaloid, triterpenoid, steroid, polifenol dan antrakuinon.

Peneliti ingin mempertegas adanya senyawa aktif dengan metode kromatografi lapis tipis. Identifikasi senyawa aktif dilakukan secara kromatografi lapis tipis untuk mengidentifikasi senyawa lebih spesifik yang terdapat dalam fraksi etil asetat ekstrak etanol daun johar. Peneliti juga ingin mengembangkan penelitian ke bakteri Gram positif lainnya seperti *Bacillus subtilis* dan *Staphylococcus epidermidis*. Bakteri *Bacillus subtilis* adalah flora normal yang terdapat pada kulit manusia dapat menyebabkan infeksi piogenik (menimbulkan nanah).

Staphylococcus epidermidis juga flora normal yang terdapat pada kulit manusia tetapi jika dalam jumlah banyak dapat menimbulkan jerawat karena membentuk enzim lipase yang dapat memecah trigliserida menjadi asam lemak bebas yang bersifat komedogenik (Efendi, 2003).

Berdasarkan latar belakang tersebut, diketahui bahwa penelitian untuk pengujian aktivitas antibakteri fraksi etil asetat dari ekstrak etanol daun johar terhadap *Staphylococcus epidermidis* dan *Bacillus subtilis* belum pernah dilakukan sebelumnya.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas, maka didapatkan rumusan masalah sebagai berikut :

1. Apakah fraksi etil asetat dari ekstrak etanol daun johar (*Cassia siamea* Lamk.) memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus epidermidis* dan *Bacillus subtilis*?
2. Apakah senyawa yang terkandung dalam fraksi etil asetat dari ekstrak etanol daun johar (*Cassia siamea* Lamk.) secara kromatografi lapis tipis?

C. Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui adanya aktivitas antibakteri fraksi etil asetat dari ekstrak etanol daun johar terhadap bakteri *Staphylococcus epidermidis* dan *Bacillus subtilis*.

2. Untuk mengetahui adanya senyawa yang terkandung dalam fraksi etil asetat dari ekstrak etanol daun johar (*Cassia siamea* Lamk.) secara kromatografi lapis tipis.

D. Manfaat Penelitian

Melalui penelitian ini diharapkan dapat menjadi rintisan awal dalam pemanfaatan bahan alam yang berperan sebagai antibakteri dari fraksi etil asetat ekstrak etanol daun johar dan menginformasikan kandungan senyawa aktif yang terkandung dalam fraksi etil asetat ekstrak etanol daun johar.

E. Tinjauan Pustaka

1. Tanaman Johar (*Cassia siamea* Lamk)

a. Klasifikasi tanaman

Klasifikasi tanaman johar menurut Hyene (1987) yaitu sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae (Tumbuhan)
Divisi	: Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
Kelas	: Magnoliopsida (berkeping dua / dikotil)
Ordo	: Fabales
Famili	: Fabaceae (suku polong-polongan)
Genus	: <i>Cassia</i>
Spesies	: <i>Cassia siamea</i> Lamk.

Johar atau juar adalah tanaman penghasil kayu keras. Tanaman johar biasanya tumbuh di tepi jalan dan dapat juga dibudidayakan. Tanaman johar

biasanya dikenal dengan nama juwar atau johor (Kemenkes RI, 1989).

Tanaman johar dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Tanaman johar (*Cassia siamea* Lamk.) (Indriyani, 2005).

b. Morfologi tanaman

Tanaman johar merupakan pohon yang berukuran sedang dengan cabang yang kuat dan halus. Batang tanaman johar tegak, berbentuk bulat, bercabang, dengan tinggi 10-20 m. Daun tanaman johar majemuk dan berwarna hijau. Bunganya berwarna kuning dan kelopak bunganya terbagi menjadi lima. Buah dari tanaman johar seperti kacang polong dengan bentuk pipih, sedangkan biji buahnya berbentuk bulat dan berwarna hitam (BPOM RI, 2008).

c. Kandungan senyawa kimia dan khasiat

Senyawa metabolit sekunder adalah senyawa kimia yang umumnya memiliki kemampuan bioaktivitas dan berfungsi sebagai pelindung tanaman dari gangguan hama penyakit untuk tanaman itu sendiri (Lenny, 2006). Khasiat daun johar sebagai obat tradisional banyak digunakan dalam

pengobatan antimalaria, kencing manis, luka, demam, gatal dan kudis (Hyene, 1987). Senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam daun johar adalah alkaloid, steroid, triterpenoid, saponin, flavonoid, dan tanin (Kemenkes RI, 1989).

2. Ekstraksi

Ekstraksi adalah proses penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak larut dengan menggunakan pelarut cair. Metode ekstraksi akan memisahkan metabolit dalam suatu tanaman yang dapat larut dan menyisakan metabolit dalam suatu tanaman yang tidak dapat larut. Hasil ekstraksi dari suatu tanaman mengandung campuran metabolit yang sangat kompleks. Senyawa kimia yang terkandung dalam simplisia digolongkan ke dalam golongan alkaloid, flavonoid, minyak atsiri, dan lain-lain. Senyawa aktif yang telah diketahui ada dalam suatu simplisia dapat memudahkan dalam pemilihan metode ekstraksi dan cairan pelarut yang akan digunakan (Depkes RI, 2000). Ada beberapa dasar metode ekstraksi yang dapat digunakan untuk penyarian diantaranya yaitu maserasi, perkolasi, dan sokhletasi (Ansel, 1989).

Perkolasi ialah salah satu metode penyarian ekstraksi cara dingin. Perkolasi merupakan proses ekstraksi dengan cara melewatkan pelarut yang sesuai secara terus menerus secara perlahan pada simplisia dalam suatu perkolator. Tahapan proses perkolasi yaitu tahap pengembangan bahan, tahap perendaman antara, tahap perkolasi sebenarnya yaitu penampungan perkolat kemudian diproses sampai menjadi suatu ekstrak kental (Depkes RI, 2000).

Dalam metode perkolasi, serbuk sampel ditempatkan pada suatu bejana silinder dengan bagian bawah diberi sekat yang berpori. Pelarut senantiasa ditambahkan dari bagian atas serbuk sampel dan dibiarkan menetes perlahan sampai bagian bawah melewati serbuk sampel tersebut, pelarut akan melarutkan zat aktif yang berada di dalam sel-sel yang dilalui sampai pada keadaan jenuh (Depkes RI, 2006). Kelebihan metode ini yaitu sampel senantiasa dialiri oleh pelarut baru yang menyebabkan pergantian pelarut dan ruang diantara butir-butir serbuk sampel yang membentuk saluran kapiler tempat cairan penyari. Hal tersebut dapat meningkatkan derajat perbedaan konsentrasi sehingga penyarian yang dilakukan lebih sempurna (Depkes RI, 1986). Kekurangan dari metode ini yaitu pelarut yang dibutuhkan banyak dan memerlukan waktu yang lama. Apabila sampel dalam perkolator tidak homogen maka pelarut akan sulit menjangkau seluruh area dalam perkolator (Mukhriani, 2014).

3. Fraksinasi

Fraksinasi adalah metode pemisahan senyawa organik berdasarkan kelarutan senyawa dalam dua pelarut yang tidak saling campur, biasanya antara pelarut air dan pelarut organik (Soebagio dkk., 2007). Fraksinasi bertujuan untuk menyederhanakan komponen senyawa dalam ekstrak. Fraksinasi dilakukan secara bertingkat berdasarkan tingkat kepolarannya yaitu dari non polar, semi polar dan polar. Senyawa yang bersifat non polar akan larut dalam pelarut non polar, senyawa yang bersifat semi polar akan larut dalam pelarut semi polar dan senyawa polar akan larut dalam pelarut polar (Harborne, 1987). Pelarut yang digunakan yaitu n-heksan, etil asetat dan air. Fraksinasi dapat

dilakukan dengan metode ekstraksi cair-cair dengan menggunakan corong pisah, kromatografi cair vakum (KCV), kromatografi kolom (KK), *size-exclusion chromatography* (SEC), *solid-phase extraction* (SPE) (Sarker dkk., 2006).

Fraaksinasi menggunakan corong pisah dilakukan memasukkan kedua pelarut yang tidak saling campur ke dalam corong pisah kemudian digojok kuat dan didiamkan. Zat terlarut akan terdistribusi ke dalam fasenya masing-masing sesuai dengan kelarutannya terhadap fase tersebut dan kemudian akan membentuk dua lapisan. Pelarut dengan massa jenis lebih besar berada di lapisan bawah dan pelarut dengan massa jenis lebih kecil berada di lapisan atas. Senyawa yang terdapat dalam ekstrak akan terpisah sesuai dengan sifat kelarutannya (Odugbemi, 2008 and Dey, 2012).

4. Tinjauan Mikrobiologi

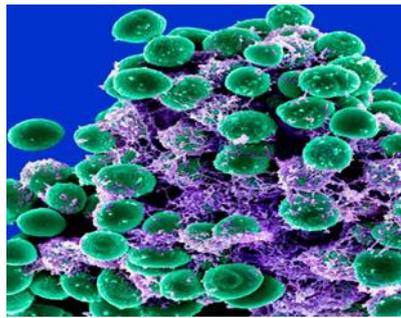
a. Bakteri *Staphylococcus epidermidis*

Klasifikasi dari *Staphylococcus epidermidis* menurut Salle (1961) sebagai berikut :

Kingdom : Bacteria
Class : Bacili
Family : Staphylococcaceae
Genus : *Staphylococcus*

Species : *Staphylococcus epidermidis*

Staphylococcus epidermidis adalah bakteri Gram positif yang berbentuk bulat, berdiameter 0,5-1,5 μm , dan bersifat anaerob fakultatif. *Staphylococcus epidermidis* terdapat dalam bentuk tunggal atau berpasangan dan secara khas membelah diri pada lebih dari satu bidang sehingga membentuk gerombolan yang tidak teratur. Suhu optimum untuk tumbuh yaitu 35–40°C (Pelczar dan Chan, 1998). Bakteri *Staphylococcus epidermidis* dapat dilihat pada gambar 2.



Gambar 2. Tampilan mikroskopis sel *Staphylococcus epidermidis* (NIAID, 2011).

Staphylococcus epidermidis menjadi lebih resisten terhadap fagositosis yaitu mekanisme pembunuhan bakteri oleh sistem kekebalan tubuh serta membuat resisten terhadap beberapa antibiotik (Lenny, 2016). Secara klinis *Staphylococcus epidermidis* menyerang orang-orang yang rentan atau orang-orang dengan imunitas rendah, seperti penderita AIDS, pasien kritis, pengguna obat terlarang (narkotika), bayi baru lahir dan pasien rumah sakit yang dirawat dalam waktu yang lama. Bakteri ini dapat menimbulkan jerawat karena membentuk enzim lipase yang dapat memecah

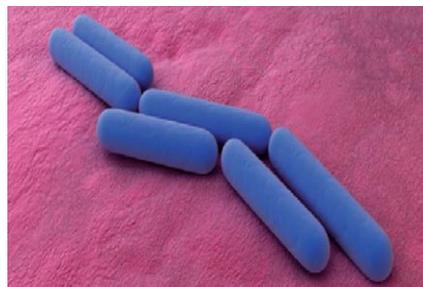
trigliserida menjadi asam lemak bebas yang bersifat komedogenik (Efendi, 2003).

b. Bakteri *Bacillus subtilis*

Klasifikasi dari *Bacillus subtilis* menurut Fritze (2004), sebagai berikut:

Kingdom : Bacteria
Class : Bacilli
Family : Bacillaceae
Genus : *Bacillus*
Spesies : *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis merupakan salah satu bakteri Gram positif yang berbentuk batang, berspora, dan bersifat aerob. Bakteri ini memiliki panjang 2-3 μm dan lebarnya 0,7-0,8 μm (Jawetz & Adelberg, 1996). *Bacillus subtilis* banyak ditemukan dalam tanah, air, dan udara. Infeksi yang dapat ditimbulkan apabila terkena bakteri *Bacillus subtilis* adalah meningitis, endokarditis, sepsikemia, dan infeksi mata (Samiullah & Bano, 2011). Bakteri *Bacillus subtilis* dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Tampilan mikroskopis sel *Bacillus subtilis* (Cartwright, 2009).

c. Antibakteri

Antibakteri yaitu zat yang dapat mengganggu pertumbuhan atau bahkan mematikan bakteri dengan cara mengganggu metabolisme mikroba. Antibakteri berdasarkan mekanisme kerjanya, dibedakan menjadi antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan dinding sel, antibakteri yang dapat mengakibatkan perubahan permeabilitas membran sel atau menghambat pengangkutan aktif melalui membrane sel, antibakteri yang menghambat sintesis protein, antibakteri yang menghambat sintesis asam nukleat sel sel (Brooks dkk., 2005).

Aktivitas antibakteri dibagi menjadi dua yaitu bakteriostatik dan bakterisidal. Bakteriostatik merupakan antibakteri yang bekerja menghambat pertumbuhan mikroorganisme tetapi tidak membunuh mikroorganisme. Bakterisidal merupakan antibakteri yang membunuh sel mikroorganisme tetapi tidak terjadi pecah sel atau lisis sel (Brooks dkk., 2005).

Antibakteri berdasarkan spektrum atau kisaran kerjanya dibedakan menjadi spektrum luas dan spektrum sempit. Spektrum luas yaitu antibakteri yang dapat menghambat atau membunuh bakteri baik bakteri Gram positif maupun bakteri Gram negatif. Spektrum sempit yaitu antibakteri yang hanya mampu menghambat atau membunuh satu golongan bakteri (hanya mampu menghambat atau membunuh bakteri Gram positif saja atau bakteri Gram negatif saja) (Pratiwi, 2008).

5. Uji Aktivitas Antibakteri

Uji antibakteri dapat dilakukan dengan metode dilusi dan difusi. Metode dilusi digunakan untuk menentukan konsentrasi terkecil suatu zat antibakteri dapat menghambat pertumbuhan atau membunuh bakteri uji. Metode dilusi membutuhkan waktu yang lama dalam pengerjaannya sehingga jarang digunakan (Jawetz dkk., 1995). Metode disk difusi (tes Kirby & Bauer) untuk menentukan kepekaan mikroorganisme terhadap berbagai macam obat-obatan. *Paper disk* yang berisi larutan uji diletakkan pada media agar yang telah ditanami mikroorganisme yang akan berdifusi pada media agar tersebut. Area jernih disekitar *paper disk* menunjukkan hambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh larutan uji pada pertumbuhan media agar. Diameter daerah hambat (DDH) menunjukkan profil penghambatan suatu zat antibakteri secara tidak langsung terhadap pertumbuhan mikroba. DDH dapat dihitung dengan jangka sorong dalam satuan mm. Pengukuran DDH dilakukan untuk mengetahui kekuatan zat antibakteri. Semakin besar DDH maka daya hambatnya terhadap bakteri uji semakin kuat. Kelebihan metode ini yaitu mudah dilakukan, relatif murah dan tidak memerlukan peralatan khusus. Kekurangan metode ini yaitu ukuran zona bening yang terbentuk tergantung pada kondisi inkubasi, inoculum, predifusi dan preinkubasi serta ketebalan medium (Pelczar and Chan, 1988).

6. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi adalah prosedur pemisahan zat terlarut oleh suatu proses dalam sistem yang terdiri dari dua fase, satu sebagai fase diam dan satu sebagai fase gerak. Fase diam bertindak sebagai penyerap, seperti halnya penyerap

alumina yang diaktifkan, silika gel dan resin penukar ion, atau bertindak melarutkan zat terlarut sehingga terjadi partisi antara fase diam dan fase gerak. Fase gerak membawa zat terlarut melalui media sehingga terpisah dari zat terlarut yang lainnya. Zat terlarut dibawa melalui media pemisah oleh suatu pelarut berbentuk cairan atau gas biasanya disebut sebagai eluen (Depkes RI, 2009).

Kromatografi lapis tipis digunakan untuk tujuan identifikasi, karena prosesnya mudah dan sederhana serta memiliki fase diam yang beragam. Dalam kromatografi lapis tipis, perbandingan jarak elusi suatu senyawa terhadap jarak elusi fase gerak dapat diukur dari titik penotolan sampel sampai pada titik senyawa tersebut memberikan intensitas maksimum dan dinyatakan sebagai harga R_f dari senyawa tersebut. *Retention factor* atau R_f adalah nilai yang didapat berdasarkan posisi noda zat terlarut pada plat kromatografi lapis tipis. Nilai R_f dapat diperoleh dengan cara membagi nilai antara jarak dari awal penotolan senyawa sampai noda senyawa tersebut berhenti ketika proses elusi dibagi dengan jarak elusi dari fase gerak (Srivastava, 2011). Apabila sampel memiliki harga R_f yang hampir sama dengan standar yang ada maka dimungkinkan sampel tersebut memiliki kandungan senyawa yang sama dengan standar yang ada (Depkes RI, 2008).

Penentuan letak bercak yang diperoleh dari hasil kromatografi lapis tipis dapat ditentukan dengan cara mengamati pada sinar ultraviolet gelombang pendek (254 nm) atau gelombang panjang (366 nm), pengamatan dengan sinar tampak atau sinar ultraviolet setelah disemprot dengan penampak bercak

(Depkes RI, 2008). Pendekteksian senyawa tak berwarna dapat dilakukan dengan pengamatan dibawah sinar ultraviolet. Senyawa organik biasanya akan bersinar atau berfluorosensi apabila disinari dengan sinar ultraviolet gelombang pendek (254 nm) atau gelombang panjang (366 nm). Apabila dengan sinar ultraviolet tidak terdeteksi maka dapat digunakan pereaksi semprot atau penampak bercak. Pengamatan setelah dipenampak bercak dapat dilakukan dengan mengamati langsung tanpa pemanasan dan jika perlu dengan pemanasan (Gritter dkk, 1991; Stahl, 1985).

F. Landasan Teori

Frakasi etil asetat ekstrak etanol daun johar terbukti memiliki potensi sebagai antibakteri terhadap bakteri Gram negatif yaitu *Eschericia coli*, *Salmonella thypi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klabisella pneumonia*, sedangkan pada bakteri Gram positif yaitu *Staphylococcus aureus*. Uji aktivitas antibakteri fraksi etil asetat ekstrak etanol daun johar dilakukan dengan seri konsentrasi 5%, 10%, 15%, dan 20%. Beberapa mikroorganisme uji yang digunakan, zona hambat terbesar terdapat pada bakteri Gram negatif yaitu *Salmonella thypi* dengan zona hambat 6 mm pada konsentrasi 5%, 9 mm pada konsentrasi 10%, 12 mm pada konsentrasi 15%, dan 18,2 mm pada konsentrasi 20% (Dahiru dkk., 2013).

Menurut penelitian yang dilakukan oleh Fitriah dkk (2017) ekstrak etil asetat daun johar dapat menyari senyawa alkaloid, tanin dan steroid. Fraksi etil asetat umumnya dapat menyari golongan senyawa flavonoid, alkaloid, triterpenoid, steroid, polifenol dan antrakuinon (Mulqie dkk, 2017; Salmasfatah, 2019; Haryati, 2015).

G. Hipotesis

Berdasarkan landasan teori di atas dapat diambil hipotesis bahwa :

- a. Fraksi etil asetat dari ekstrak etanol daun johar memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Stapylococcus epidermidis* dan *Bacillus subtilis*.
- b. Senyawa yang terkandung dalam fraksi etil asetat dari ekstrak etanol daun johar (*Cassia siamea* Lamk.) adalah alkaloid, flavonoid, tanin, polifenol, triterpenoid dan steroid.

BAB II. METODE PENELITIAN

A. Bahan dan Alat yang Digunakan

1. Bahan

- a. Bahan untuk pembuatan ekstrak dan fraksi : daun johar (*Cassia siamea* Lamk) yang didapat dari Kota Semarang, etanol 96%, n-heksan, etil asetat, aquadest.
- b. Bahan untuk pembiakan bakteri : aquadest, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *brain heart infusion broth* (BHI), *brain heart infusion agar*, Mc Farland, suspensi bakteri.
- c. Bahan untuk identifikasi golongan senyawa : aquadest, kertas saring, pereaksi Mayer, pereaksi Dragendroff, FeCl₃, HCl, kuersetin, amoniak (NH₃), NaCl 2%, gelatin 2%, lempeng silica gel GF 254, kloroform, aseton, asam formiat.
- d. Bahan untuk uji aktivitas antibakteri : aquadest, *media mueller hilton agar*, inokulum bakteri, NaCl 0,9%, kloramfenokol, DMSO, *blank disk*.

2. Alat

- a. Alat untuk membuat serbuk simplisia : tampah, oven, timbangan elektrik (Ohaus), alat penyerbuk, *moisture balance* (Ohaus).
- b. Alat untuk proses ekstraksi dan fraksinasi : timbangan elektrik simplisia (Hennerr), perkolator (Pyrex), seperangkat alat gelas (Pyrex), corong pisah (Pyrex), penguap vakum putar (Heildolph).

- c. Alat untuk identifikasi golongan senyawa : seperangkat alat gelas (Pyrex), chamber (Camag), kompor listrik, cawan porselen.
- d. Alat untuk uji aktivitas antibakteri : cawan petri, seperangkat alat gelas (Pyrex), bunsen, mikropipet, yellow tip, blue tip.

B. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Determinasi dilakukan di laboratorium Ekologi dan Biosistemika, Jurusan Biologi Fakultas MIPA, Universitas Diponegoro Semarang. Determinasi dilakukan dengan mencocokkan bagian-bagian tanaman dengan kunci yang ada di buku standar.

2. Pembuatan serbuk daun johar

Daun johar dicuci bersih kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C (Hasanah dkk, 2017). Daun johar yang telah kering kemudian dilakukan pengecekan kadar airnya menggunakan *moisture balance*. Daun johar kering kemudian diserbuk menggunakan alat penyerbuk (Depkes RI, 2000).

3. Pembuatan ekstrak etanol daun johar

Ekstraksi dilakukan menggunakan metode perkolasi dengan pelarut etanol 96%. Serbuk daun johar ditimbang sebanyak 200 g, dan dimasukkan ke dalam perkolator kemudian ditambahkan pelarut etanol 96% sebanyak 1.000 mL, dan dijenuhkan selama 24 jam. Serbuk daun johar dialiri secara terus menerus dengan pelarut etanol 96% sampai perkolat yang didapat berwarna

bening. Hasil perkolat yang didapat dipisahkan dari pelarutnya menggunakan penguap vakum putar, pada suhu 50°C dengan kecepatan 60 rpm sampai diperoleh ekstrak kental daun johar. Rendemen ekstrak dapat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{Rendemen ekstrak} = \frac{\text{berat ekstrak kental}}{\text{berat serbuk simplisia}} \times 100 \%$$

4. Pembuatan fraksi etil asetat dari ekstrak etanol daun johar

Ekstrak etanol daun johar sebanyak 20 gram dilarutkan dalam air:etanol (9:1) (Herli dan Isna, 2019) yaitu etanol 96% sebanyak 20 mL dan air sebanyak 180 mL kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah. Fraksinasi dilakukan dengan menggunakan pelarut n-heksan dengan perbandingan 1:1 yaitu n-heksan 200 mL dan air 200 mL lalu digojok selama 15 menit kemudian didiamkan selama 30-60 menit. Terbentuk dua lapisan setelah didiamkan yaitu lapisan n-heksan berada di bagian atas dan lapisan air berada di bagian bawah. Lapisan n-heksan dipisahkan dari lapisan air dan disebut sebagai fraksi n-heksan. Fraksinasi dengan pelarut n-heksan dilakukan sampai lapisan bagian atas berwarna jernih kemudian lapisan bagian bawah dilakukan fraksinasi dengan menggunakan etil asetat. Fraksinasi dengan pelarut etil asetat dilakukan dengan perbandingan yang sama. Pemisahan dilakukan sampai lapisan bagian atas berwarna jernih, kemudian fraksi etil asetat yang diperoleh dikentalkan dengan penguap vakum putar sampai didapatkan fraksi kental daun johar. Rendemen fraksi dapat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{Rendemen fraksi} = \frac{\text{berat fraksi kental}}{\text{berat ekstrak}} \times 100 \%$$

5. Sterilisasi untuk uji aktivitas antibakteri

Sterilisasi alat-alat yang berbahan kaca seperti cawan petri, erlenmeyer, tabung reaksi, gelas beaker dan gelas ukur disterilisasi dengan autoklaf pada tekanan 1 atm dengan suhu 121°C selama 15 menit. Sterilisasi alat-alat yang berbahan logam dilakukan dengan pemijaran di atas api bunsen. Sterilisasi alat-alat yang berbahan plastik dilakukan dengan cara kimiawi yaitu menggunakan alkohol 70% (Waskita, 2013).

6. Pembuatan media

a. Media *brain heart infusion* agar (BHI)

Sebanyak 4,7 gram serbuk BHI agar dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan dilarutkan dengan 100 mL aquadest. Media dipanaskan di atas kompor sampai terlarut sempurna. Erlenmeyer yang berisi media tadi disterilkan menggunakan autoklaf pada tekanan 1 atm dengan suhu 121°C selama 15 menit. Media yang sudah steril dituang ke dalam cawan petri dan ditunggu hingga memadat (Adrianto, 2012).

b. Media *brain heart infusion* broth (BHI)

Sebanyak 3,7 gram serbuk BHI broth dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan dilarutkan dengan 100 mL aquadest. Media kemudian dipanaskan di atas kompor sampai semua bahan terlarut sempurna. Media tersebut kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada tekanan 1 atm dengan suhu 121°C selama 15 menit (Adrianto, 2012).

c. Media mueller hilton agar (MHA)

Sebanyak 3,82 gram serbuk MHA dimasukkan ke dalam erlenmeyer lalu dilarutkan dengan 100 mL aquadest. Media kemudian dipanaskan di atas kompor sampai semua bahan terlarut sempurna. Media tersebut kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada tekanan 1 atm dengan suhu 121°C selama 15 menit (Rezi dkk., 2014).

7. Peremajaan kultur bakteri

Masing-masing bakteri *Staphylococcus epidermidis* dan *Bacillus subtilis* dari kultur murni bakteri diinokulasikan pada media BHI agar. Penggoresan dilakukan secara zig-zag pada permukaan media, kemudian di inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Suryani dkk., 2014).

8. Pembuatan suspensi bakteri

a. Bakteri *Staphylococcus epidermidis*

Bakteri *Staphylococcus epidermidis* dari hasil peremajaan bakteri diambil sebanyak satu ose menggunakan kawat ose. Diinokulasi ke dalam tabung reaksi yang berisi 10 mL media BHI broth, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam (Suryani dkk., 2014).

b. Bakteri *Bacillus subtilis*

Bakteri *Bacillus subtilis* dari hasil peremajaan bakteri diambil sebanyak satu ose dengan menggunakan kawat ose. Diinokulasi ke dalam

tabung reaksi yang berisi 10 mL BHI broth, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam (Suryani dkk., 2014).

9. Pembuatan larutan standar Mc Farland

Sebanyak 9,95 mL larutan asam sulfat dan 0,05 mL larutan barium klorida ke dalam tabung reaksi dan dikocok homogen. Apabila kekeruhan suspensi bakteri uji sama dengan kekeruhan suspensi standar Mc Farland maka konsentrasi bakteri uji adalah 10^8 koloni/ml (Rezi dkk., 2014).

10. Pembuatan larutan uji fraksi etil asetat ekstrak etanol daun johar

Fraksi etil asetat ekstrak etanol daun johar dibuat larutan stok sebesar 250 mg/mL dengan cara menimbang fraksi etil asetat sebanyak 1,25 gram dan dilarutkan dalam 5 mL DMSO. Larutan uji dibuat seri konsentrasi 50 mg/mL, 100 mg/ mL, 150 mg/mL, 200 mg/mL, 250 mg/mL. Larutan stok dipipet sebanyak 0,2 mL, 0,4 mL, 0,6 mL, 0,8 mL, dan 1.000 mL dari larutan stok, kemudian ditambahkan DMSO hingga volume dari masing-masing konsentrasi 1 mL (kecuali seri konsentrasi 250 mg/mL karena jumlahnya sudah 1 mL) (Lampiran 3). Seri konsentrasi tersebut digunakan untuk uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Bacillus subtilis*.

Pengujian aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus epidermidis* dilakukan dengan larutan stok yang dibuat sebesar 500 mg/mL dengan cara menimbang fraksi etil asetat sebesar 2,5 gram dan dilarutkan dalam 5 mL DMSO. Larutan uji dibuat seri konsentrasi 300 mg/mL, 400 mg/mL, 500 mg/mL dengan mengambil dari larutan stok sebanyak 0,6 mL, 0,8 mL, 1.000

mL. Pengambilan seri konsentrasi menggunakan mikropipet, larutan uji tersebut ditambahkan DMSO hingga volume masing-masing konsentrasi 1 mL (kecuali seri konsentrasi 500 mg/mL karena jumlahnya sudah 1 mL) (Lampiran 4).

11. Uji aktivitas antibakteri *Staphylococcus epidermidis*

Sebanyak 2.500 µl suspensi bakteri uji dicampur kedalam 22,5 mL media MHA dalam keadaan hangat kemudian dituang ke dalam cawan petri dan ditunggu hingga memadat. Setiap *blank disk* diteteskan 10 µl fraksi etil asetat dengan konsentrasi mulai dari 500 µg/disk, 1.000 µg/disk, 1.500 µg/disk, 2.000 µg/disk, 2.500 µg/disk. Media uji dibagi menjadi 6 sektor dengan kontrol positif yaitu kloramfenikol 30 µg/disk di letakkan pada bagian tengah. Media diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Diamati dan diukur diameter daerah hambat yang terbentuk (Mahmudah dan Atun, 2017).

12. Uji aktivitas antibakteri *Bacillus subtilis*

Sebanyak 2500 µl suspensi bakteri uji dicampur ke dalam 22,5 mL media MHA dalam keadaan hangat kemudian dituang ke dalam cawan petri dan ditunggu hingga memadat. Setiap *blank disk* diteteskan 10 µl fraksi etil asetat dengan konsentrasi mulai dari konsentrasi 3.000 µg/disk, 4.0000 µg/disk, 5.000 µg/disk. Media dibagi menjadi 4 sektor dan kontrol positif yaitu kloramfenikol 30 µg/disk di letakkan pada bagian tengah. Media diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Diamati dan diukur diameter daerah hambat yang terbentuk (Mahmudah dan Atun, 2017).

13. Identifikasi golongan senyawa secara kromatografi lapis tipis

Skrining fitokimia dilakukan secara uji tabung sebagai uji pendahuluan sebelum dilanjutkan dengan uji kromatografi lapis tipis. Skrining fitokimia secara uji tabung dilakukan sebagai berikut :

a. Identifikasi tanin

Sebanyak 50 mg fraksi etil asetat dari ekstrak etanol daun johar dilarutkan dalam 10 mL aquadest panas kemudian disaring. Larutan dibagi menjadi ke 3 tabung reaksi, tabung pertama ditambah dengan larutan NaCl 1% , tabung kedua ditambah dengan larutan NaCl 1% dan larutan gelatin 5%, sedangkan tabung ketiga ditambah dengan larutan FeCl₃.

b. Identifikasi alkaloid

Sebanyak 50 mg fraksi etil asetat dari ekstrak etanol daun johar dilarutkan dalam 10 mL HCl 2N lalu disaring, larutan kemudian dibagi kedalam 3 tabung reaksi. Tabung pertama digunakan sebagai kontrol tanpa pereaksi, tabung kedua ditambah dengan pereaksi Dragendroff dan tabung ketiga ditambah dengan pereaksi Wagner (Harborne, 1987).

c. Identifikasi flavonoid

Sebanyak 50 mg fraksi etil asetat dari ekstrak etanol daun johar dilarutkan dalam 5 mL etanol kemudian disaring. Larutan kemudian ditambah dengan serbuk logam Mg dan 3 mL amil alkohol. Setelah itu

ditambahkan HCl pekat beberapa tetes melalui dinding tabung (Nugrahani dkk., 2016).

d. Identifikasi polifenol

Sebanyak 50 mg fraksi etil asetat dari ekstrak etanol daun johar dilarutkan dalam 5 mL etanol kemudian larutan ditambah dengan pereaksi FeCl_3 5% (Nugrahani dkk., 2016).

e. Identifikasi terpenoid dan steroid

Sebanyak 50 mg fraksi etil asetat dari ekstrak etanol daun johar dilarutkan dalam 5 mL etanol kemudian ditambahkan 1 mL asam asetat anhidrat dan 1 mL asam sulfat pekat (Nugrahani dkk., 2016)

Fraksi etil asetat ekstrak etanol daun johar sebanyak 50 mg dilarutkan dalam metanol. Lempeng silika gel sebelum dilakukan penotolan dipanaskan terlebih dahulu dengan oven pada suhu 100°C selama 30 menit. Fraksi etil asetat ekstrak etanol daun johar yang telah dilarutkan dalam metanol ditotolkan pada lempeng silika gel kemudian dielusi dengan fase gerak kloroform : aseton : asam formiat (7,5 : 1,9 : 0,6) dalam bejana. Lempeng silika gel yang telah dielusi diangkat dan dikeringkan menggunakan *hair dryer*. Lempeng tersebut dilakukan pengamatan di bawah sinar UV gelombang pendek 254 nm dan sinar UV gelombang panjang 366 nm setelah itu dilakukan identifikasi golongan senyawa menggunakan pereaksi semprot.

C. Analisis Data

1. Uji aktivitas antibakteri

Analisis secara deskriptif yaitu adanya aktivitas antibakteri berupa terbentuknya zona hambat yang diukur diameternya dengan jangka sorong. Hasil pengukuran diameter tersebut berupa diameter daerah hambat (DDH). Tipe zona hambat yaitu radikal dan irradikal. Zona radikal adalah zona jernih yang terbentuk di sekitar kertas cakram dimana tidak ditemukan pertumbuhan bakteri. Zona irradikal adalah zona di sekitar kertas cakram dimana pertumbuhan bakteri yang tidak terlalu rapat atau masih jarang (Brooks dkk., 2004). Zona hambat diukur dengan jangka sorong sehingga diperoleh data berupa diameter daerah hambat (DDH).

2. Identifikasi senyawa kimia

1. Tanin

Hasil positif senyawa tanin ditandai dengan terbentuknya endapan setelah penambahan NaCl 1% dan gelatin 5% (Harborne, 1987).

2. Alkaloid

Hasil positif senyawa alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna jingga sampai kecoklatan pada kedua pereaksi yaitu Wagner dan Dragendroff menunjukkan adanya senyawa alkaloid (Harborne, 1987).

3. Flavonoid

Hasil positif senyawa flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna kuning, merah atau jingga pada lapisan atas setelah penambahan amil alkohol, serbuk Mg dan HCl pekat (Nugrahani dkk., 2016).

4. Polifenol

Hasil positif senyawa polifenol ditandai dengan terbentuknya perubahan warna menjadi biru, biru kehitaman, biru kehijauan atau memberikan warna yang lebih gelap setelah penambahan FeCl_3 5% (Nugrahani dkk., 2016).

5. Terpenoid dan Steroid

Hasil positif senyawa terpenoid ditandai dengan terbentuk cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan dua pelarut sedangkan terbentuknya warna biru atau hijau menunjukkan steroid (Nugrahani dkk., 2016).

3. Uji KLT

Analisis secara deskriptif dengan menghitung nilai R_f dibandingkan dengan nilai R_f pembanding dan menggunakan pereaksi semprot dengan menyemprotkan reagen penampak bercak pada lempeng yaitu FeCl_3 untuk mendeteksi senyawa polifenol yang akan menghasilkan warna hitam dan uap amonia untuk mendeteksi senyawa flavonoid yang akan menghasilkan warna kuning, hijau atau biru (Wagner and Blatt, 1996) dan menghitung nilai R_f senyawa lalu dibandingkan dengan nilai R_f pembanding.

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh senyawa}}{\text{Jarak yang ditempuh fase gerak}}$$

HALAMAN INI TIDAK TERSEDIA

BAB III

DAPAT DIAKSES MELALUI

UPT PERPUSTAKAAN UNWAHAS

antibakteri dengan metode dilusi untuk mengetahui kadar hambat minimum (KHM) dari fraksi etil asetat ekstrak etanol daun johar. Kadar hambat minimum (KHM) adalah konsentrasi terendah dari zat antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri (Pratiwi, 2008).

BAB IV. KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

1. Fraksi etil asetat ekstrak etanol daun johar memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Bacillus subtilis* dan *Staphylococcus epidermidis*.

2. Fraksi etil asetat ekstrak etanol daun johar mengandung senyawa flavonoid dan polifenol secara kromatografi lapis tipis.

B. Saran

1. Perlu dilakukan pengujian penetapan kadar senyawa aktif yang terdapat dalam fraksi etil asetat ekstrak etanol daun johar.
2. Perlu dilakukan pengujian aktivitas antibakteri dengan metode dilusi untuk mengetahui kadar hambat minimum (KHM) dari fraksi etil asetat ekstrak etanol daun johar.

DAFTAR PUSTAKA

- Adrianto, A, W., 2012, Uji Daya Antibakteri Ekstrak Daun Salam (*Eugenia Polyantha* Wight) Dalam Pasta Gigi Terhadap Pertumbuhan *Streptococcus mutans*, *Skripsi*, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember.
- Alamsjah, M. A., Nurhayati, D, Tjahjaningsih, W., 2011, Pengaruh Ekstrak Alga Cokelat (*Sargassum sp.*) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli* Secara In Vitro, *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*, Vol.3, No.1
- Ansel, H.C. 1989, *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi*, Jakarta, Universitas Indonesia (UI-Press).
- Atun, S., (2014), Metode Isolasi dan Identifikasi Struktur Senyawa Organik Bahan Alam, *Jurnal Konservasi Cagar Budaya Borobudur*, 8(2), 53–61.
- BPOM RI, 2008, *Informatorium Obat Nasional Indonesia (IONI)*, Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia, Jakarta.
- Brooks, G.F., Janet, S. B., dan Stephen A. M., 2005, *Mikrobiologi Kedokteran Buku 1*, Jakarta, Salemba Medika.
- Cartwright, Peter. 2009. Probiotic News: *Bacillus subtilis* – Identification and Safety. *Protexin Health Care*. No: 2
- Dahiru, D., A.R. Malgwi., H. S. Sambo., 2013, Growth Inhibitory Effect of *Senna siamea* Leaf Extracts on Selected Microorganisms, *Journal of Medicine and Medical Sciences*, American. 3(5), 103-107.
- Depkes RI.. 1986, *Sediaan Galenik*, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta, 14-27.
- Depkes RI., 2000, *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan, Jilid I*, Direktorat Jendral POM, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- Depkes RI., 2009, *Farmakope Herbal Indonesia Edisi 1*, Departemen Kesehatan RI, Jakarta, 162-163.
- Ditjen, POM., 1979, *Farmakope Indonesia edisi 3*, Departemen kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- Effendi, H., 2003, *Telaah Kualitas Air bagi Pengelolaan Sumber Daya dan Lingkungan Perairan*, Cetakan Kelima, Kanisius, Yogyakarta.
- Fadlila, W.N., Yuliawati, K.M., dan Syafnir, L., 2015, Identifikasi Senyawa Aktif Antibakteri dengan Metode Bioautografi Klt terhadap Ekstrak Etanol

- Tangkai Daun Talas (*Colocasia Esculenta* (L.) Schott), *Jurnal Akademika Unisba*, 583-590.
- Febriany, S. 2004. Pengaruh Beberapa Ekstrak Tunggal Bangle dan Gabungannya yang Berpotensi Meningkatkan Aktivitas Enzim Lipase Secara In Vitro, *Skripsi*.Bogor, Fakultas MIPA IPB.
- Fitriah, Mappiratu dan Prismawiryanti., 2017, Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Tanaman Johar (*Cassia siamea* Lamk.) dari Berbagai Tingkat Kepolaran Pelarut, *Jurnal Riset Kimia*, 3(3),242-251.
- Fritze, D., 2004, Taxonomy of the Genus Bacillus and Related General: The Aerobic Endospore Forming Bacteria, *The American Phytopathological Society*, **94**, 1245-1248.
- Gritter, R., Bobbit, J. M., Schwarting, A. E., 1991. *Pengantar Kromatografi*, Diterjemahkan oleh Padmawinata K. ITB, Bandung.
- Handayani., 2007. Skrining Kapang Endofit penghasil Antimikroba dari Ranting Tanaman *Garcinia tetranda* Pierre terhadap *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella thyposa*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, dan *Aspergillus niger*, *Skripsi*, Depok, FMIPA UI.
- Harborne, J. B., 1987, *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*, Edisi ke-2, Bandung, ITB.
- Harborne, A., 1998, *Phytochemical Method a Guide to Modern Techniques of Plants Analysis*: Springer Science and Business Media.
- Haryati, N.A., Saleh, C., dan Erwin., 2015, Uji Toksisitas dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Merah Tanaman Pucuk Merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*, *Jurnal Kimia Mulawarman*, **13**, 35-40.
- Herli, Muhammad Azharu dan Isna Wardaniati, 2019, Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol dan Fraksi Daun Ketapang yang Tumbuh di Sekitar Univ. Abdurrab, Pekanbaru, *Journal Of Pharmacy Science*, 2(2),38-42.
- Hyene, K., 1987, *Tanaman Berguna Indonesia Jilid III*, Edisi 1, Jakarta, Balai Litbang Kehutanan.
- Indrayanto, G., 2006, Prospek (Kimia) Bahan Alam untuk Penemuan Obat Baru, *Seminar Umum Pendidikan Program Studi*, Universitas Mulawarman.
- Indriyani T., dan Wulandari Y., 2005, *IBM Pengolahan Daun Johar*, Institut Teknologi Adhi Tama, Surabaya.

- Jawetz, M. A., 2010, *Mikrobiologi Kedokteran*, New York, Mc Graw Hill.
- Jawetz , M. A., 1996, *Mikrobiologi Kedokteran*, EGC, Jakarta.
- Jawetz, M. A., 2005, *Mikrobiologi Kedokteran edisi 23*, Diterjemahkan oleh Mudihargi, E., Kuntamah, Wasito, E. B., Mertaningsih, N. M., Huriwati, H. Dkk. EGC. Jakarta.
- Kandi, V., 2015, Bacterial capsule, colony morphology, functions and its relationship to virulence and diagnosis, Prathima Institute of Medical Science, India, 151-153.
- Kemenkes RI, 1989, *Material medika indonesia jilid V*, Jakarta direktorat pengawasan obat dan makanan.
- Lenny, S., 2006. Senyawa Flavonoida, fenilpropanoida dan alkaloida, *Karya Ilmiah*, Departemen Kimia, FMIPA Universitas Sumatera Utara, Medan,.
- Lenny, A.A., 2016, Daya Hambat Ekstrak Buah Alpukat (Oersea Americana Mill) Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Staphylococcus epidermidis*, *Skripsi*, Universitas Muhammadiyah, Semarang.
- Mahmudah, F. L., dan Atun, S., 2017, Uji Aktivitas Antibakteri pada Ekstrak Etanol Temu Kunci (*Boesenbergia Pandurata*) terhadap bakteri *Streptococcus mutans*, *Jurnal Penelitian Saintek*, Vol 22, No. 1.
- Maslahat, M., Syaawalz A., dan Restianingsih R., 2013, Identifikasi Senyawa Kimia Pada Simplisia Daun Sirsak (*Annona muricate* Linn.), *Journal Universa Medicina*, **30**, 3-10
- Mukhriani, 2014, Ekstraksi, Pemisahan Senyawa dan Identifikasi Senyawa Aktif, *Jurnal Kesehatan*, **7**, 361-367.
- Mukti, D., 2012, Uji Efektivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Buah Pare (*Momordica charantia* L.) terhadap *Streptococcus mutans* Penyebab Karies gigi, *Skripsi*, Universitas Pakuan, Bogor.
- Mulqie, Lanny., S. Hazar., dan A. F. Septian., 2017, Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Etil Asetat Daun Sambiloto (*Andrographis paniculata*(Burm.f) Wallich ex Nees) Terhadap Bakteri *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Jurnal Farmasi Galenika*, 4 (2), 33-37.
- NIAID (National Institute of Allergy and Infectious Diseases), 2011, *Staphylococcus epidermidis* bacteria, *Public Health Images Library*.

- Nugrahani, R., Andayani, Y., dan Hakim, A., 2016, Skrining Fitokimia Dari Ekstrak Buah Buncis (*Phaseolus vulgaris* L) Dalam Sediaan Serbuk, *Jurnal Penelitian Pendidikan IPA*, **2**, 1-7.
- Odugbemi, T., 2008, *A Textbook Of Medicinal Plants From Nigeria*, Nigeria, University of Lagos Press.
- Pelczsar, M.J., E.S.Chan., 1988, *Dasar-dasar Mikrobiologi edisi ke-2*, Jakarta, Penerbit Universitas Indonesia.
- Pratiwi, S.T., 2008, *Mikrobiologi Farmasi*, Jakarta, Erlangga, 150-171.
- Putra, K. H. P., 2018. Aktivitas Ekstrak Etanol 96% Semanggi (*Marsilea Crenata* C. Presl.) Terhadap Peningkatan Kepadatan Tulang Trabecular Femur Pada Mencit (*Mus Muacullus*) Jantan, *Skripsi*, Malang, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Rezi, J., Andarwati, R., dan Fauzi, Z, I., 2014, Uji Aktivitas Antibakteri Rebusan Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus*, *Jurnal Ilmiah PANMED*, 8(3),263-266.
- Robinson, T., 1991, *Kandungan Organik Tumbuhan Tingkat Tinggi*, diterjemahkan oleh Kosasih, Bandung, ITB.
- Saimullah & Bano, A., 2011, In Vitro Inhibition Potential of Four Chenopod Halophytes Against Microbial Growth, *Park J. Bct*, 43,123-127.
- Salle, A., 1961, *Fundamental Pirnciple of Bacteriology*, 5th Ed, Mc Graw Hill Book Company, Inc, New York.
- Salmasfattah, Novyananda., 2019, Aktivitas Antineuroinflamasi Fraksi Etil Asetat Daun Semanggi (*Marsiela crenata* C. Presl) Secara In Vitro pada Sel Mikroglia HMC3, *Skripsi*, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim, Malang.
- Sarker, Satyajit D., Zahid Latif, dan Alexander I, Gray., 2006, *Natural Products Isolation*, Totowa, Humania Press.
- Sastrohamidjojo, H., 2007, *Dasar-Dasar Spektrosfotokopi edisi kedua*, Jogjakarta, Liberty.
- Soebagio, B., Rusdiana, T., dan Kairudin., 2007, *Pembuatan gel dengan aqupec HV-505 dari ekstrak umbi bawang merah (Allium cepa, L.) sebagai antioksidan*, Bandung, Unpad.
- Srivastava, M., 2011. *High Performance Thin Layer Cromatography (HPTLC)*, Heidelberg, Springer.

- Steenis, CGGJ van., 1981, *Flora untuk sekolah di Indonesia*, Jakarta, Pradnya Paramita.
- Stahl, E., 1985, *Analisis obat secara kromatografi dan mikroskopi*, edisi terjemahan (Diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata, Iwang Soediro, Bandung, ITB press.
- Suryani, S., Roza, R.M., dan Martina, A., 2014, Seleksi Dan Uji Aktibakteri Aktinomisetes Asal Tanah Gambut Rimbo Panjang Kampar Riau Terhadap *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi*, *Jurnal JOM FMIPA*, 1(2), 1-11.
- Wagner, H., Bladt, S., 1996, *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas, Second Edition*, New York, Springer.
- Waskita, M. A., 2013, Daya Antibakteri Supernatan Isolat bacillus subtilis dari Tanah terhadap Bakteri *Aeromonas hydrophila* dan *Staphylococcus aureus* Secara In Vitro, *Skripsi*, Universitas Airlangga, Surabaya.
- Yuhernita, dan Juniarti, 2011, Analisis Senyawa Metabolit Sekunder Dari Ekstrak Metanol Daun Surian Yang Berpotensi Sebagai Antioksidan, *Makara Sains*, 1 (15), 48-52.