AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI AIR DARI EKSTRAK ETANOL DAUN JOHAR (Cassia siamea Lamk.) DAN IDENTIFIKASI GOLONGAN SENYAWA AKTIF

SKRIPSI



oleh: Uswatun Khasanah 165010053

FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS WAHID HASYIM
SEMARANG
Maret 2021

AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI AIR 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:

Uswatun Khasanah 165010053

FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS WAHID HASYIM
SEMARANG
Maret 2021

INTISARI

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

Daun johar mengandung metabolit sekunder berupa alkaloid, flavonoid, saponin, dan tanin. Fraksinasi oleh air digunakan untuk menyari senyawa polar. Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dapat digunakan dalam uji aktivitas antibakteri untuk mewakili profil bakteri Gram positif dan Gram negatif. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas fraksi air ekstrak etanol daun johar sebagai antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* serta kandungan senyawa aktifnya.

Serbuk daun johar diekstraksi menggunakan metode perkolasi dengan penyari etanol 96%. Ekstrak yang diperoleh dilakukan fraksinasi bertingkat dengan pelarut air, n-heksan, etil asetat. Fraksi air dibuat seri konsentrasi 6.000 μg/disk, 7.000 μg/disk, 8.000 μg/disk, 9.000 μg/disk, 10.000 μg/disk. Analisis data dilakukan secara deskriptif dilihat dari terbentuknya zona jernih disekitar disk. Uji pendahuluan berupa skrining fitokimia terhadap senyawa flavonoid, alkaloid, tanin, dan saponin dilanjutkan identifikasi KLT terhadap senyawa alkaloid, tanin, dan saponin. Pengamatan hasil KLT dilakukan secara deskriptif.

Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi air ekstrak etanol daun johar dapat menghambat *Staphylococcus aureus* dengan diameter daerah hambat yang dihasilkan berturut-turut 7,99; 8,3; 9,33; 9,82; 10,67 mm sedangkan pada *Escherichia coli* dengan konsentrasi sama memiliki diameter daerah hambat berturut-turut 7,77; 8,05; 8,15; 8,42; 9,67 mm. Hasil identifikasi secara KLT fraksi air ekstrak etanol daun johar mengandung alkaloid, tanin, dan saponin.

Kata Kunci : antibakteri, fraksi air, daun johar (*Cassia siamea* Lamk.), *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*

ABSTRACT

ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF WATER FRACTION FROM ETHANOL EXTRACT OF JOHAR LEAVES (Cassia siamea Lamk.) AND IDENTIFICATION OF ACTIVE COMPOUNDS

Johar leaves contain secondary metabolites in the form of alkaloids, flavonoids, saponins, and tannins. The fractionation by water is used to search for polar compounds. Staphylococcus aureus and Escherichia coli bacteria can be used in the antibacterial activity test to represent the profile of Gram-positive and Gram-negative bacteria. This study aims to determine the activity of the waterfraction of the ethanol extract of johar leaves as an antibacterial against Staphylococcus aureus and Escherichia coli and its active compound content.

Johar leaf powder was extracted using the percolation method with a 96% ethanol filter. The extract obtained was fractionated with water, n-hexane, ethyl acetate as a solvent. The water fraction is made into a concentration series of 6000 µg/disk, 7000 µg/disk, 8000 µg/disk, 9000 µg/disk, 10000 µg/disk.Data analysis was carried out descriptively as seen from the formation of a clear zone around the disc. The precursor test is in the form of phytochemical screening for flavonoids, alkaloids, tannins, and saponins, indications of TLC against alkaloids, tannins, and saponins. The observation of the results of TLC was carried out descriptively.

The results of the antibacterial activity test of the waterfraction of the ethanol extract of johar leaves can inhibit Staphylococcus aureus with the resulting inhibition area diameter 7.99; 8.3; 9.33; 9.82;10.67 mm, while the Escherichia coli with the same concentration had a diameter of the inhibition zone, respectively 7.77; 8.05; 8.15; 8.42; 9.67 mm. TLC test results by water fraction of the ethanol extract of johar leaves contain alkaloids, tannins, and saponins.

Keywords: antibacterial, water fraction, johar leaves (Cassia siamea Lamk.), Staphylococcus aureus, Escherichia coli

PENGESAHAN SKRIPSI

Berjudul

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

oleh: Uswatun Khasanah 165010053

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

Pembimbing Utama,

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

Mengetahui: Fakultas Farmasi

Universitas Wahid Hasyim

(Dr. apt. Maulita Cut Nuria., M.Sc.)

SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Uswatun Khasanah

NIM : 165010053

Judul Skripsi : Aktivitas Antibakteri Fraksi Air 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, 6 Maret 2021

Uswatun Khasanah

"Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, dan silih bergantinya malam dan siang terdapat tanda-tanda bagi orang yang berakal." (Q.S. Ali Imron; 190)

Kupersembahkan untuk:

Kedua orang tua sebagai wujud hormat dan baktiku Almamater sebagai wujud terima kasih dan khidmahku

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh.

Segala puji dan syukur alhamdulillah penulis panjatkan kepada ALLAH SWT atas segala rahmat dan hidayah-Nya yang telah diberikan sehingga peneliti bisa menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi yang berjudul "Aktivitas Antibakteri Fraksi Air dari Ekstrak Etanol Daun Johar (*Cassia siamea* Lamk.) dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif". Skripsi ini merupakan salah satu syarat memperoleh gelar Sarjana Farmasi di Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim.

Shalawat serta salam semoga tercurah atas Nabi kita MUHAMMAD SAW dan semoga tercurah atas keluarganya, sahabatnya dan para pengikutnya hingga akhir zaman.

Penulis menyampaikan terima kasih yang sebesar besarnya kepada:

- Ibu Dr. apt. Maulita Cut Nuria, M. Sc selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim Semarang
- 2. Ibu apt. Dewi Andini Kunti Mulangsri, M. Farm selaku dosen pembimbing yang tiada henti-hentinya meluangkan waktu dan pemikirannya untuk membimbing penulis dalam penyelesaian 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 masukkan kepada penulis.
- 4. Dosen-dosen di Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim Semarang yang telah memberikan bekal ilmu pengetahuan sebagai dasar penulisan skripsi ini.

Pimpinan dan staf laboratorium Mikrobiologi Fakultas Farmasi Universitas
 Wahid Hasyim yang telah mengizinkan dan membantu pelaksanaan penelitian ini.

Pihak pihak lain yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah membantu dalam penulisan skripsi ini. Penghargaan setinggi tingginya dan rasa terima kasih penulis persembahkan kepada kedua orang tua tercinta Ayahanda Wahidin dan Ibunda Iptiyah yang tak henti hentinya memberi do'a dan motivasi serta dukungan baik dalam bentuk moril terlebih lagi dalam bentuk materil, sehingga tugas akhir ini dapat terselesaikan dengan baik karena kasih sayang serta bimbingan beliau, dan untuk saudara saudara tercinta, serta keluarga besar penulis yang tidak dapat penulis sebut satu persatu, terima kasih atas do'a dan kasih sayang dan bimbingannya kepada penulis, tiada kata yang pantas untuk mengungkapkan betapa besar cinta dan kasih sayang yang telah kalian berikan. Semoga Allah SWT senantiasa memberikan rahmat dan perlindungan-Nya kepada kalian.

Oleh karena itu, penulis sangat mengharapkan masukan, kritik dan saran demi perbaikan dan penyempurnaan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi penelitian selanjutnyaAamiin Ya Rabbal Alamin.

Wassalammu'alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Semarang, 6 Maret 2021

Uswatun Khasanah

DAFTAR ISI

INTISARI	ii
ABSTRACT	iii
PENGESAHAN SKRIPSI Error! Bookma	rk not defined.
SURAT PERNYATAAN	V
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
BAB I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	3
C. Tujuan Penelitian	3
D. Manfaat Penelitian	3
E. Tinjauan Pustaka	4
1. Tanaman Johar (Cassia siamea Lamk.)	4
2. Tinjauan Mikrobiologi	6
3. Ekstraksi	10
4. Fraksinasi	12
5. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	13
6. Penentuan Aktivitas Antibakteri	14
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
A. Jalannya Penelitian	17
Determinasi Tanaman Johar	17

2	Pembuatan Serbuk Simplisia Daun Johar	17
3	S. Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Johar	18
4	. Pembuatan Fraksi Air dari Ekstrak Etanol Daun Johar	18
5 D	5. Skrining Fitokimia secara Uji Tabung dari Fraksi Air Ekstrak Etanol Daun Johar	19
6	6. Identifikasi Golongan Senyawa Aktif secara Kromatografi Lapis Tipis KLT)	
7	. Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Air Ekstrak Etanol Daun Johar	22
B.	Analisis Data	24
BAB	III. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	27
A.	Determinasi Tanaman Johar	27
B.	Pembuatan Serbuk Simplisia Daun Johar	27
C.	Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Johar	28
D.	Pembuatan Fraksi Air dari Ekstrak Etanol Daun Johar	29
E. Joh	Skrining Fitokimia secara Uji Tabung dari Fraksi Air Ekstrak Etanol Danar	
F. (KI	Identifikasi Golongan Senyawa Aktif secara Kromatograf Lapis Tipis LT)	31
G.	Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Air Ekstrak Etanol Daun Johar	33
BAB	IV. KESIMPULAN DAN SARAN	38
A.	Kesimpulan	38
B. S	Saran	38
DAF	ΓAR PUSTAKA	39
LAM	PIR A N	44

DAFTAR TABEL

Tabel I.	Hasil Skrining Fitokimia Fraksi Air Ekstrak Etanol Daun Johar29
Tabel II.	Nilai DDH Fraksi Air Ekstrak Etanol Daun Johar (FAEEDJ) terhadap
	pertumbuhan Bakteri Staphylococcus aureus dan Escherichia coli35

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.Tanaman Johar (<i>Cassia siamea</i> Lamk)	4
Gambar 2. Tampilan mikroskopis dari sel bakteri Staphylococcus aureus	6
Gambar 3. Tampilan mikroskopis dari sel bakteri Escherichia coli	8
Gambar 4. Hasil KLT setelah disemprot penampak bercak dan dilihat pada sinar	
tampak (a) 1= alkaloid, (b) 2= tanin, (c) 3= saponin	32
Gambar 5.Hasil Uji aktivitas Antibakteri Fraksi Air Ekstrak Etanol Daun Johar	
terhadap Bakteri (a) Staphylococcus aureus dan (b) Escherichia coli	
pada Media MHA	34

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Determinasi Tanaman	45
Lampiran 2. Perhitungan Simplisia, Ekstrak, dan Fraksi Daun Johar	46
Lampiran 3. Perhitungan Pembuatan Seri Konsentrasi Fraksi Air Ekstrak Etano	ol
Daun Johar	47
Lampiran 4. Dokumentasi Penelitian	49
Lampiran 5. Skrining Fitokimia	51
Lampiran 6. Uji KLT	52
Lampiran 7. Uji Aktivitas Antibakteri	53

BAB I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Indonesia terkenal merupakan negara besar yang karena keanekaragamannya, salah satunya adalah keanekaragaman hayati (megabiodiversity) (Suhartini, 2009). Banyak dari jenis tumbuhan telah digunakan oleh nenek moyang bangsa Indonesia sebagai jamu tradisional untuk mengobati berbagai macam penyakit. Salah satu pemanfaatan tumbuhan sebagai obat tradisonal adalah sebagai antibakteri pada beberapa jenis penyakit infeksi, seperti infeksi kulit ringan (Seran, 2020) ataupun infeksi yang dapat menyebabkan diare (Handayani dan Natasia, 2018).

Infeksi yang menyerang manusia dapat disebabkan oleh bakteri Gram positif atau bakteri Gram negatif. Salah satu bakteri Gram positif adalah *Staphylococcus aureus* yang dapat menyebabkan infeksi kulit seperti impetigo. *Staphylococcus aureus* dapat menimbulkan penyakit melalui kemampuan berkembangbiak dan menyebar luas dalam jaringan dan melalui pembentukan berbagai zat ekstraseluler. Bakteri Gram negatif salah satunya adalah *Escherichia coli* yang dapat menyebabkan diare. *Escherichia coli* menjadi patogen jika jumlah bakteri dalam saluran pencernaan meningkat atau berada di luar usus (Jawetz dkk, 2007).

Salah satu tanaman yang dipercaya dapat dijadikan obat tradisional adalah johar (*Cassia Siamea* Lamk.). Daun johar dilaporkan banyak digunakan dalam

pengobatan tradisional antara lain sebagai obat malaria, gatal, kudis, kencing manis, demam, luka dan dimanfaatkan sebagai tonik karena memiliki kandungan flavonoid dan karotenoid yang cukup tinggi (Heyne, 1987). Berdasarkan penelitian oleh Fitriah dkk (2017), telah dilakukan uji aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol daun johar terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dengan senyawa aktif yang terkandung antara lain alkaloid, flavonoid, saponin, dan tanin. Senyawa aktif yang terkandung dalam daun johar diduga memiliki potensi sebagai antibakteri, sehingga perlu dilakukan eksplorasi bahan alam terutama terhadap tanaman johar sebagai skrining awal dalam pemanfaatan bahan alam yang berperan sebagai antibakteri.

Ekstrak etanol daun johar yang digunakan dalam penelitian tersebut masih dalam bentuk ekstrak kasar dimana senyawa yang tersari masih cukup kompleks, sehingga proses fraksinasi dilakukan untuk menyari senyawa sesuai dengan tingkat kepolarannya. Fraksi air daun bidara menggunakan proses fraksinasi dengan pelarut yang sama yaitu air dapat menyari senyawa antara lain flavonoid, saponin, dan tanin (Hidayah dkk., 2020).

Senyawa aktif yang berperan dalam aktivitas biologis tertentu seperti antibakteri, umumnya tidak hanya berasal dari satu senyawa saja. Oleh karena itu, identifikasi senyawa secara KLT penting dilakukan untuk mendeteksi senyawa yang terkandung dalam tumbuhan (Rafi dkk., 2017). Berdasarkan latar belakang yang menyebutkan bahwa daun johar memiliki aktivitas antibakteri, maka akan diteliti potensi fraksi air ekstrak etanol daun johar sebagai antibakteri

Staphylococcus aureus dan Escherichia coli serta identifikasi senyawa aktifnya menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis.

B. Rumusan Masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

- 1. Apakah fraksi air dari ekstrak etanol daun johar (*Cassia siamea* Lamk.) memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*?
- 2. Apakah senyawa aktif yang terkandung dalam fraksi air dari ekstrak etanol daun johar (*Cassia siamea* Lamk.) secara Kromatografi Lapis Tipis?

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk:

- 1. Mengetahui kemampuan fraksi air dari ekstrak etanol daun johar (Cassia siamea Lamk.) sebagai antibakteri terhadap bakteri Staphylococcus aureus dan Escherichia coli.
- 2. Mengetahui adanya senyawa yang terkandung dalam fraksi air dari ekstrak etanol daun johar (*Cassia siamea* Lamk.) secara Kromatografi Lapis Tipis.

D. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat menjadi rintisan pemanfaatan bahan alam yang berperan sebagai antibakteri dari fraksi air ekstrak etanol daun johar (*Cassia Siamea* Lamk.).

E. Tinjauan Pustaka

1. Tanaman Johar (Cassia siamea Lamk.)

a. Deskripsi Tanaman Johar

Johar memiliki nama ilmiah *Cassia siamea* Lamk. merujuk pada tanah asalnya yakni Siam atau Thailand. Johar memiliki tinggi 10-20 m. Batang berbentuk bulat, tegak, berkayu, dan berwarna putih kotor. Daun majemuk dan berwarna hijau. Daun menyirip genap dan mempunyai anak daun berbentuk bulat panjang. Ujung dan pangkal daun membulat, bertepi rata, panjang daun 3-7,5 cm dan lebar 1-2,5 cm (Badan POM RI, 2008).

Bunga majemuk, berwarna kuning, terletak di ujung batang serta kelopak bunga berbagi lima, berwarna hijau kekuningan, dengan benang sari ±1 cm, kepala sari berwarna coklat, putik berwarna hijau kekuningan. (Badan POM RI, 2008). Buah johar berupa polong, pipih dan berbelah dua dengan panjang 15 cm hingga 20 cm dan lebar kurang lebih 1,5 cm. Polong yang masih muda berwarna hijau dan ketika sudah tua akan berubah menjadi cokelat (Heyne, 1987). Tampilan tanaman johar (Cassia siamea Lamk.) dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Tanaman Johar (Cassia siamea Lamk) (Indriyani dan Wulandari, 2015)

b. Klasifikasi

Menurut Heyne (1987), tanaman johar diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom : Plantae (Tumbuhan)

Subkingdom: Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)

Super Divisi : Spermatophyta (Menghasilkan biji)

Divisi : Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)

Kelas : Magnoliosida (Berkeping dua/dikotil)

Sub Kelas : Rosidae

Ordo : Fabales

Famili : Fabaceae (Suku polong-polongan)

Genus : Cassia

Spesies : Cassia siamea, Lamk

c. Kandungan senyawa

Kandungan kimia dari daun johar antara lain alkaloid, steroid, triterpenoid, saponin, flavoniod dan tanin (Depkes RI, 1989). Menurut penelitian yang dilakukan Smith (2009), metabolit sekunder yang telah ditemukan pada daun johar terdiri dari saponin, antrakuinon, flavonoid, alkaloid, tanin dan phlobatannin.

d. Khasiat

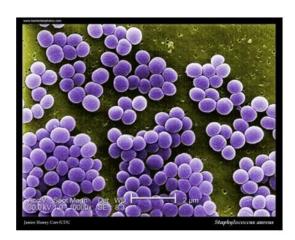
Daun johar dilaporkan banyak digunakan dalam pengobatan tradisional antara lain sebagai obat malaria, gatal, kudis, kencing manis, demam, luka dan dimanfaatkan sebagai tonik karena memiliki kandungan flavonoid dan karotenoid yang cukup tinggi (Heyne, 1987). Berdasarkan penelitian yang

dilakukan oleh Tenriugi dkk (2018), ekstrak etanol daun johar mempunyai aktivitas antimikroba terhadap *Candida albicans* penyebab penyakit kulit.

2. Tinjauan Mikrobiologi

a. Bakteri Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus merupakan bakteri flora normal pada kulit, saluran pernafasan, dan saluran pencernaan makanan pada manusia, selain itu juga ditemukan di udara dan lingkungan sekitar. Staphylococcus aureus dapat menimbulkan penyakit melalui kemampuan berkembangbiak dan menyebar luas dalam jaringan dan melalui pembentukan berbagai zat ekstraseluler seperti bembentukan koagulase, katalase, eksotoksin, lekosidin, dan enterotoksin. Bersifat patogen salah satunya dengan menginfeksi langsung pada luka, misalnya infeksi pada luka pasca operasi (Jawetz dkk, 2007). Tampilan mikroskopis bakteri Stahylococcus aureus dapat dilihat pada gambar 2.



Gambar 2. Tampilan mikroskopis dari sel bakteri Staphylococcus aureus (Car, 2016)

Bakteri *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri Gram positif yang berbentuk bola, tidak bergerak, biasanya peka terhadap panas, berdiameter 0,5-1,5 mm, dan tersusun dalam komponen-komponen tidak teratur. Dinding selnya mengandung dua komponen yaitu peptigoglikon dan asam metabolik aerob, satu-satu atau berpasangan, dan ditemukan di selaput kulit. Bakteri ini mengandung polisakarida antigenik dan protein, serta substansi penting lainnya di dalam struktur dinding sel (Jawetz dkk., 2007). Menurut Todar (2020), *Staphylococcus aureus* dikasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom: Bacteria

Phylum: Firmicutes

Class : Bacilli

Order : Bacillales

Family: Staphylococcaceae

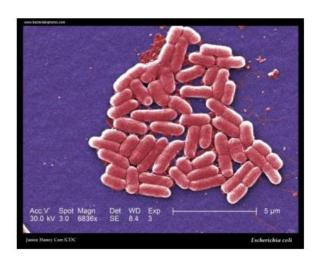
Genus : Staphylococcus

Species : S. aureus

b. Bakteri Escherichia coli

Theodor Escherich pertama kali menggambarkan *Escherichia coli* pada tahun 1885, sebagai Bacterium coli commune, yang diisolasi dari kotoran bayi yang baru lahir. Ia kemudian berganti nama menjadi *Escherichia coli*, dan selama bertahun-tahun bakteri itu hanya dianggap sebagai organisme komensal di usus besar. Baru pada tahun 1935 strain *Escherichia coli* terbukti menjadi penyebab terjangkitnya diare pada bayi (Todar, 2020).

Bakteri *Escherichia coli* adalah salah satu bakteri yang digunakan sebagai indikator adanya kontaminasi feces dan kondisi sanitasi yang tidak baik terhadap air, makanan, dan minuman. *Escherichia coli* menjadi patogen jika jumlah bakteri dalam saluran pencernaan meningkat atau berada di luar usus, menghasilkan enterotoksin sehingga menyebabkan terjadinya bebarapa infeksi yang berasosiasi dengan enteropatogenik kemudian menghasilkan enterotoksin pada sel epitel. Manifestasi klinik infeksi oleh *Escherichia coli* bergantung pada tempat infeksi dan tidak dapat dibedakan dengan gejala infeksi yang disebabkan oleh bakteri lain (Jawetz, 2007). Tampilan mikroskopis bakteri *Escherichia coli* dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Tampilan mikroskopis dari sel bakteri Escherichia coli (Car, 2016)

Bakteri *Escherichia coli* merupakan bakteri Gram negatif berbentuk batang pendek, dengan diameter 0,7-1,2 µm, memiliki flagel, membentuk koloni bulat, cembung, halus dan beberapa strain mempunyai kapsul. Bakteri *Escherichia coli* merupakan bakteri Gram negatif dinding selnya mengandung lapisan peptodoglikan yang tipis, membran luar yang terdiri dari

protein, lipoprotein, fosfolipid, lipopolisakarida dan membran dalam. Selain itu, dinding sel bakteri Gram negatif mengandung polisakarida dan lebih rentan terhadap kerusakan mekanik dan kimia. *Escherichia col i*merupakan bakteri fakultatif anaerob, kemoorganotropik, mempunyai tipe organisme fermentasi dan respirasi (Jawetz dkk., 1996). Menurut Todar (2020), *Escherichia coli* diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Class : Gamma Proteobacteria

Order : Enterobacteriales

Family: Enterobacteriaceae

Genus : Escherichia

Species : E. coli

c. Antibakteri

Antibakteri adalah obat yang digunakan untuk membasmi bakteri, khususnya bakteri yang merugikan manusia. Obat-obat yang digunakan untuk membasmi mikroorganisme penyebab infeksi pada manusia, hewan maupun tumbuhan harus bersifat toksisitas selektif artinya obat atau zat tersebut harus bersifat toksik terhadap mikroorganisme penyebab penyakit, tetapi relatif tidak toksik terhadap jasad inang atau hospes (Djide dan Sartini, 2008).

Berdasarkan daya menghambat atau membunuhnya, antibakteri dibedakan menjadi dua kelompok, yaitu berspektrum sempit (*narrow spectrum*) dan berspektrum luas (*broad spectrum*). Antibakteri yang

berspektrum sempit yaitu antibakteri hanya dapat bekerja terhadap bakteri tertentu saja, misalnya hanya terhadap bakteri Gram positif saja atau Gram negatif saja. Antibakteri yang berspektrum luas dapat bekerja dengan baik pada bakteri Gram negatif maupun Gram positif (Talaro, 2008).

Kloramfenikol merupakan antibiotik spektrum luas. Kloramfenikol akan melekat pada subunit 50s ribosom bakteri sehingga menghalangi enzim peptidil-tranferase. Enzim inilah yang melaksanakan 3 langkah dengan membentuk ikatan peptida antara asam amino baru yang masih melekat pada tRNA, dan asam amino terakhir peptida yang sedang berkembang. Hal ini menyebabkan sintesis protein terhenti seketika (Volk dan Wheeler, 1988).

3. Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses penarikan zat pokok yang diinginkan dari bahan mentah obat dengan menggunakan pelarut sesuai (Voigt, 1994). Pelarut ekstraksi yang digunakan antara air, eter atau campuran etanol dan air. Ekstraksi menggunakan pelarut dibedakan menjadi dua, yaitu metode dingin dan panas. Metode dingin terdiri dari maserasi dan perkolasi, sedangkan metode panas terdiri dari refluks, soxhletasi, digesti, infus dan dekok. Metode ekstraksi dipilih berdasarkan sifat dari bahan mentah obat dan daya penyesuaian dengan tiap macam metode ekstraksi dan juga kepentingan dalam memperoleh ekstrak yang sempurna atau bahkan mendekati sempurna dari bahan obat. Sifat suatu bahan mentah obat merupakan faktor utama yang harus dipertimbangkan dalam memilih metode ekstraksi yang sesuai (Ansel, 1989).

Perkolasi berasal dari kata 'percolare' yang artinya penetesan, merupakan ekstraksi yang dilakukan dengan penetesan cairan penyari dalam wadah silinder atau kerucut (perkolator), yang memilki jalan untuk masuk dan keluar. Bahan penyari yang dimasukkan secara kontinyu dari atas akan mengalir lambat melintasi simplisia yang umumnya berupa serbuk kasar secara terus-menerus oleh pelarut. Sebelum perkolasi dilakukan, simplisia terlebih dahulu direndam menggunakan pelarut dan dibiarkan membengkak agar mempermudah pelarut masuk ke dalam sel (Voigt, 1994). Perkolasi lebih baik dibandingkan dengan cara maserasi dikarenakan adanya aliran cairan penyari menyebabkan pergantian larutan yang terjadi dengan larutan yang konsentrasinya lebih rendah sehingga meningkatkan derajat perbedaan konsentrasi dan keberadaan ruangan di antara butir-butir serbuk simplisia membentuk saluran kapiler tempat mengalir cairan penyari menyebabkan meningkatnya perbedaan konsentrasi (Depkes RI, 1989).

Pelarut untuk proses ekstraksi akan memberikan efektivitas yang tinggi, jika memperhatikan kelarutan senyawa bahan alam dalam pelarut tersebut. Secara umum pelarut-pelarut golongan alkohol merupakan pelarut yang paling banyak digunakan dalam proses isolasi senyawa organik bahan alam, karena dapat melarutkan seluruh senyawa metabolit sekunder (Lenny, 2006). Salah satu pelarut yang umum digunakan adalah etanol karena memiliki rumus molekul C₂H₅OH, dimana C₂H₅ merupakan gugus yang bersifat non polar dan OH merupakan gugus yang bersifat polar, sehingga pelarut etanol

dapat menarik kandungan kimia yang bersifat polar maupun non polar (Mahatriny, 2013).

4. Fraksinasi

Fraksinasi atau sering disebut partisi cair-cair merupakan proses pemisahan antara zat cair dengan zat cair. Fraksinasi dilakukan secara bertingkat berdasarkan tingkat kepolarannya yaitu dari non polar, semi polar, dan polar. Proses fraksinasi bertujuan untuk menyederhanakan komponen senyawa dalam ekstrak. Dalam proses penyederhanaan ekstrak, senyawa-senyawa akan terpisahkan dalam pelarut berdasarkan kepolarannya (Gandjar dan Rohman, 2007). Senyawa yang memiliki sifat non polar akan larut dengan pelarut non polar, yang semi polar akan larut dalam pelarut semi polar dan yang bersifat polar akan larut kedalam pelarut polar (Harborne, 1987).

Teknik pemisahan ini biasanya dilakukan dengan menggunakan corong pisah. Kedua pelarut yang saling tidak bercampur tersebut dimasukkan ke dalam corong pisah, kemudian digojok dan didiamkan. Solut atau senyawa organik akan terdistribusi ke dalam fasenya masing-masing tergantung pada kelarutannya terhadap fase tersebut dan akan terbentuk dua lapisan, yaitu lapisan atas dan lapisan bawah yang dapat dipisahkan dengan membuka kunci pipa corong pisah (Dey, 2012). Ekstrak dipartisi dengan menggunakan peningkatan polaritas pelarut seperti petrolum eter, n-heksana, klorofom, dietil eter, etilasetat dan etanol. Pemilihan pelarut umumnya tergantung pada sifat senyawa, contohnya senyawa yang bersifat nonpolar akan terekstraksi pada pelarut yang relatif nonpolar seperti n-heksana sedangkan senyawa yang

semipolar terlarut pada pelarut yang semipolar seperti etil asetat atau diklorometana (Venn, 2008).

5. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis merupakan metode pemisahan senyawa kimia. Senyawa yang diuji dapat berupa senyawa tunggal maupun campuran dari produk pabrik, hasil sintesa, isolasi dari hewan percobaan, tanaman maupun mikroorganisme. KLT adalah salah satu metode pemisahan komponen dalam suatu sampel dimana komponen tersebut didistribusikan di antara dua fasa yaitu fasa gerak dan fasa diam (Gritter, 1991).

Fase diam adalah suatu lapisan yang dibuat dari bahan-bahan berbutirbutir halus yang ditempatkan pada lempengan. Adapun macam-macam fase diam adalah silica gel, alumina, selulosa, resen, kieselguhr, magnesium silikat. Fase gerak adalah medium angkut dan terdiri atas satu atau beberapa pelarut. Fase ini bergerak di dalam fase diam karena adanya gaya kapiler. Macam-macam fase gerak antara lain heksana, toluen, eter, kloroform, aseton, etil asetat, asetonitril, etanol, methanol dan air. Pemisahan secara kromatografi dilakukan dengan memperhatikan secara langsung beberapa sifat fisika dari zat yang terlibat adalah kecenderungan molekul untuk melarut dalam cairan, kecenderungan molekul untuk melekat pada permukaan serbuk halus, kecenderungan molekul untuk menguap atau berubah ke keadaan uap (Gritter, 1991).

6. Penentuan Aktivitas Antibakteri

Penentuan aktivitas antibakteri dapat dilakukan dengan metode dilusiatau difusi. Metode dilusi atau sumuran, dilakukan dengan memasukkan larutan uji konsentrasi tertentu ke dalam sumuran. Sedangkan metode difusi atau cakram kertas saring dapat dilakukan dengan mengisi sejumlah obat yang ditempatkan pada permukaan medium padat, yang sebelumnya diolesi bakteri uji. Diameter zona hambat yang terbentuk disekitar cakram digunakan untuk mengukur kekuatan hambat obat. Metode difusi agar dipengaruhi faktor kimia, faktor antar obat dan organisme (Jawetz dkk, 2007).

Keuntungan metode difusi adalah dapat dengan mudah menentukan potensi antibakteri mengukur diameter zona radikal dan zona iradikal dibanding dengan metode dilusi yang pengamatannya sulit karena warna ekstrak sangat berpengaruh. Zona radikal adalah suatu daerah disekitar sumuran yang sama sekali tidak terlihat pertumbuhan bakteri, sedangkan zona iradikal adalah daerah disekitar sumuran yang pertumbuhan bakterinya dihambat oleh zat antimikroba tetapi tidak dimatikan. Kekurangan metode ini adalah aktivitas antibakterinya dapat dipengaruhi oleh tebal tipisnya medium dan faktor difusibilitas obat karena suspensi bakteri tidak tersebar merata seperti metode dilusi (Jawetz dkk, 1986).

F. Landasan Teori

Berdasarkan penelitian dari Mehta (2014), ekstrak etanol, metanol, etilasetat, n-heksan, kloroform, petroleum eter, aseton dan air dari daun johar memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus*

pyogenes, Escherichia coli, dan Pseudomonas aeruginosa. Penelitian lain yang dilakukan oleh Usman (2014), membuktikan bahwa ekstrak air daun johar memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri Escherichia coli, Salmonella typhi, dan Staphylococcus aureus dengan daya hambat berturut-turut 10,00; 14,00; 15,00 mm.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Smith (2019), ekstrak etanol daun johar mengandung senyawa saponin, antrakuinon, flavonoid, alkaloid, tanin dan phlobatannin. Penelitian lain dilakukan oleh Doughari dan Okafor (2008), menyebutkan bahwa daun johar memiliki senyawa akaloid, saponin, tanin, dan glikosida.

Penelitian yang dilakukan oleh Sari dan Turahman (2018) dan Hidayah dkk (2020), fraksi air dari bagian tanaman yaitu daun dengan proses ekstraksi menggunakan pelarut etanol, dan dilakukan proses fraksinasi bertingkat menggunakan pelarut yang sama yaitu n-heksan, etil asetat, dan air dapat menyari senyawa flavonoid, tanin, dan saponin.

G. Hipotesis

- 1. Fraksi air ekstrak etanol daun johar (*Cassia siamea* Lamk.) memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.
- 2. Fraksi air ekstrak etanol daun johar (*Cassia siamea* Lamk.) mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, dan tanin.

BAB II. METODE PENELITIAN

A. Bahan dan Alat yang Digunakan

1. Bahan

- a. Bahan untuk ekstraksi dan fraksinasi: daun johar diperoleh di kelurahan
 Petompon Kota Semarang, bahan penyari etanol 96%, n-heksan, etil asetat, aquadest.
- b. Bahan untuk pembiakan bakteri dan uji aktivitas metode difusi agar: bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli, brain heart infusion agar* (BHIA), *brain heart infusion broth* (BHIB), *mueller-hinton agar* (MHA), kloramfenikol 30 µg/disk, aquadest steril, *blankdisk*.
- c. Bahan untuk skrining fitokimia secara uji tabung: FeCl₃, Dragendorff,
 Mayer, Wagner, aquadest, NaCl 1%, gelatin 5%, HCl 2N.
- d. Bahan untuk identifikasi secara Kromatografi Lapis Tipis: Silika gel F₂₅₄, fase gerak senyawa tanin dan saponin menggunakan etanol:etil asetat (9:1), alkaloid menggunakan fase gerak klroform:metanol (9:1), penampak bercak FeCl₃, anisaldehid-asam sulfat.

2. Alat

- a. Alat untuk membuat serbuk simplisia: oven, tampah, timbangan elektrik, alat penyerbuk, dan alat ukur kadar air (*moisture balance*).
- b. Alat untuk ekstraksi dan fraksinasi: seperangkat alat perkolasi, alat-alat gelas, penguap vakum putar (Heidolph), alat pengering beku (Christ), corong pisah, klem dan statip.

- c. Alat untuk pembiakan bakteri dan uji aktivitas metode difusi agar: mikropipet, blue tip, yellow tip dan alat-alat gelas.
- d. Alat untuk skrining fitokimia secara uji tabung: alat-alat gelas, rak tabung, pipet, cawan porselen, kertas saring, kompor listrik.
- e. Alat untuk identifikasi Kromatografi Lapis Tipis: seperangkat alat gelas, chamber (Camag), pipa kapiler.

A. Jalannya Penelitian

1. Determinasi Tanaman Johar

Determinasi tanaman johar dilakukan dengan cara mencocokkan bagian-bagian tanaman dengan deretan kunci pada buku standar (Van, 2003). Determinasi tanaman dilakukan di Labolatorium Ekologi dan Biofarmasetika Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang.

2. Pembuatan Serbuk Simplisia Daun Johar

Daun Johar diperoleh dari Kota Semarang dan dilakukan proses meliputi sortasi basah, pencucian, pengeringan dansortasi kering. Pengeringan dilakukan menggunakan oven pada suhu 50°C. Daun yang telah kering dapat dilihat dari perubahan warna menjadi cokelat dan daun mudah hancur. Simplisia yang sudah kering dibuat serbuk menggunakan alat penyerbuk, selanjutnya diperiksa kadar air menggunakan alat pengukur kadar air. Syarat kadar air untuk simplisia tidak lebih dari 10% (Depkes RI, 2000).

3. Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Johan

Serbuk simplisia daun johar sebanyak 200 gram dimasukkan ke dalam tabung perkolator dan dibasahi dengan penyari etanol 96% sebanyak 500 mL. Simplisia yang sudah dibasahi dilakukan penjenuhan dengan cara menambahkan penyari etanol 96% sebanyak 500 mL hingga total penyari yang digunakan sebanyak 1000 mL dan didiamkan selama 24 jam. Perkolator ditutup rapat dan diletakkan terhindar dari cahaya matahari langsung. Simplisia kemudian dialiri etanol 96% hingga warna simplisia memucat atau tetesan perkolat jernih dari tetesan sebelumnya (Mulangsri dkk, 2018). Perkolat yang didapatkan diuapkan pelarutnya dengan penguap vakum putar pada suhu 50°C dengan kecepatan 60 rpm sampai diperoleh ekstrak kental daun johar. Rendemen ekstrak dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

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

4. Pembuatan Fraksi Air dari Ekstrak Etanol Daun Johan

Ekstrak etanol daun johar dilarutkan dalam campuran air:etanol dengan perbandingan 9:1 (Herli dan Wardaniati, 2019). Campuran air:etanol 9:1 yaitu sejumlah 180 mL air dan 20 mL etanol. Ekstrak etanol daun johar yang sudah larut dimasukkan dalam corong pisah, dilakukan fraksinasi dengan pelarut n-heksan dengan jumlah pelarut yang digunakan yaitu 1:1 dan dilakukan penggojokan selama ± 15 menit. Setelah didiamkan selama 30-60 menit maka akan terbentuk dua lapisan yaitu lapisan n-heksan dan air. Lapisan yang berada bagian atas dipisahkan sebagai fraksi n-heksan. Lapisan

bagian bawah yaitu air, dilakukan fraksinasi berulang menggunakan n-heksan sampai didapat lapisan n-heksan yang jernih. Lapisan air dilakukan fraksinasi kembali dengan menambahkan pelarut etil asetat dengan perbandingan yang sama, maka akan terbentuk lapisan etil asetat dan air kemudian lapisan atas dipisahkan sebagai fraksi etil asetat. Proses fraksinasi dilakukan hingga didapat lapisan etil asetat yang jernih. Lapisan bagian bawah yang diperoleh yaitu fraksi air, kemudian di keringkan dengan alat pengering beku (freeze drying).

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

5. Skrining Fitokimia secara Uji Tabung dari Fraksi Air Ekstrak Etanol Daun Johar

a. Uji Flavonoid

Fraksi air kering ditimbang sebanyak 50 mg dilarutkan dalam 5 mL etanol p.a kemudian disaring. Larutan tersebut dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan dengan 0,1 gram logam Mg dan 3 mL amil alkohol. Setelah itu ditambahkan 5 tetes HCl pekat melalui dinding tabung, lalu dikocok dengan kuat hingga memisah dan diamati perubahan warna yang terbentuk (Sarker dkk, 2006).

b. Uji Alkaloid

Fraksi air kering ditimbang sebanyak 50 mg dan dilarutkan dengan 10 mL HCl 2 N kemudian disaring. Larutan tersebut dibagi menjadi 4 bagian dalam tabung reaksi. Tabung A sebagai kontrol tanpa pereaksi, tabung B direaksikan dengan Mayer, tabung C direaksikan dengan

Wagner, dan tabung D direaksikan dengan Dragendorff. Masing masing larutan dipanaskan. Kemudian larutan ditambahkan masing masing 3 tetes pereaksi Mayer, Wagner, Dragendorff (Sarker dkk, 2006).

c. Uji Tanin

Fraksi air kering ditimbang sebanyak 50 mg dan dilarutkan dalam 20 ml aquadest kemudian disaring. Larutan dibagi menjadi 4 bagian dalam tabung reaksi. Tabung A sebagai kontrol tanpa pereaksi, tabung B direaksikan dengan NaCl, tabung C direaksikan dengan gelatin 5%+ NaCl 1%, tabung D direaksikan dengan FeCl₃. Masing masing ditambahkan pereaksi sebanyak 3 tetes (Sarker dkk, 2006).

d. Uji Saponin

Fraksi air kering ditimbang sebanyak 50 mg dan dilarutkan dalam 10 ml aquadest kemudian disaring. Filtratnya digunakan sebagai larutan uji. Filtrat kemudian dikocok selama ± 10 detik dan dibiarkan busa bertahan selama 15 menit atau lebih (Sarker dkk, 2006).

6. Identifikasi Golongan Senyawa Aktif secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Senyawa aktif yang diidentifikasi dengan KLT adalah alkaloid, tanin, dan saponin. Bejana pengembang sebelumnya dijenuhkan terlebih dahulu dengan fase gerak. Plat KLT yang digunakan sepanjang 10 cm. Plat KLT ditandai menggunakan penggaris pada jarak 1 cm dari batas bawah dan 1 cm dari batas atas plat. Jarak 1 cm dari batas atas dilakukan pengerokkan plat sebagai pembatas agar hasil elusi tidak hilang. Fraksi air ekstrak etanol daun

johar yang sudah dilarutkan dalam etanol p.a kemudian ditotolkan sebanyak 2 kali penotolan menggunakan pipa kapiler pada bagian bawah plat KLT yang sudah ditandai dan ditunggu hingga kering. Plat dielusi dalam bejana yang berisi fase gerak hingga sampel terelusi sempurna sampai batas atas. Plat KLT yang telah dielusi diangkat dan dikeringkan menggunakan *hair dryer* pada bagian belakang plat untuk menghilangkan cairan eluen, kemudian diamati bercaknya pada sinar UV 254, UV 366, dan sinar tampak. Setelah itu, dilakukan identifikasi golongan senyawa menggunakan pereaksi semprot dan dihitung nilai Rf pada bercak KLT. Nilai Rf dihitung dengan rumus sebagai berikut:

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

Identifikasi senyawa aktif menggunakan peraksi semprot :

1) Alkaloid

Pembanding yang digunakan untuk identifikasi senyawa alkaloid adalah kafein. Senyawa alkaloid diidentifikasi menggunakan pereaksi Dragendroff yang akan terbentuk bercak berwarna cokelat jingga pada plat KLT yang dilihat dengan pengamatan visual (Wagner dan Bladt, 1996).

2) Tanin

Pembanding yang digunakan untuk identifikasi senyawa tanin adalah asam tanat. Senyawa tanin diidentifikasi menggunakan reagen FeCl₃ yang akan terbentuk bercak berwarna kehitaman pada plat KLT dengan pengamatan visual (Wagner dan Bladt, 1996).

3) Saponin

Senyawa saponin diidentifikasi menggunakan pereaksi anisaldehid-asam sulfat yang akan memberikan warna biru sampai biru violet terkadang berupa bercak warna merah, kuning, biru tua, ungu, hijau, atau berupa kuning coklat pada plat KLT yang dilihat dengan pengamatan visual (Wagner dan Bladt, 1996).

7. Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Air Ekstrak Etanol Daun Johar

a. Sterilisasi alat untuk pengujian aktivitas antibakteri

Cawan petri beserta alat-alat gelas dicuci bersih dan ditiriskan, kemudian dibungkus menggunakan plastik dan ditempelkan autoklaf tape. Cawan petri dan alat-alat gelas dimasukkan ke dalam autoklaf pada tekanan 1 atm dengan pengaturan suhu 121°C selama 15 menit (Fitri dkk, 2014).

b. Pembuatan media

1) Media brain heart infusion agar (BHIA) untuk peremajaan bakteri

Media BHIA sebanyak 4,7 gram dilarutkan dalam 100 mL aquadest dan dipanaskan di atas kompor hingga terlarut sempurna. Media tersebut kemudian 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).

2) Media *brain heart infusion* broth (BHIB) digunakan untuk suspensi bakteri Media BHIB sebanyak 3,7 gram dilarutkan dalam 100 mL aquadest dan dipanaskan di atas kompor hingga semua bahan terlarut sempurna. Media tersebut kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada tekanan 1 atm dengan suhu 121°C selama 15 menit (Adrianto, 2012).

3) Media *mueller hinton agar* (MHA) digunakan untuk uji antibakteri metode difusi agar

Media MHA sebanyak 3,8 gram dilarutkan dalam 100 mL aquadest dan dipanaskan hingga larut sempurna. Media tersebutkemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada tekanan 1 atm dengan suhu 121°C selama 15 menit (Rezi dkk, 2014).

c. Pembuatan Larutan Standar Mc Farland

Larutan Asam Sulfat 9,95 mL ditambah 0,05 mL larutan Barium Klorida dimasukkan kedalam tabung reaksi kemudian di cocok hingga homogen. Apabila kekeruhan suspensi bakteri uji sama dengan kekeruhan suspensi standar *Mc Farland*, maka konsentrasi bakteri uji adalah 10⁸ koloni/ml (Rezi dkk, 2014).

d. Pembuatan Suspensi Bakteri

Biakan hasil peremajaan bakteri *Staphylococcus aureus* diambil sebanyak 1 ose kemudian diinokulasi kedalam tabung reaksi yang berisi media BHIB 10 mL, suspensi bakteri kemudian inkubasi pada suhu 37° C selama 18-24 jam. Hal yang sama diterapkan juga terhadap bakteri *Escherichia coli* (Utomo dkk, 2018).

e. Pembuatan Larutan Uji Fraksi Air Ekstrak Etanol Daun Johar

Fraksi air ekstrak etanol daun johar ditimbang sebanyak 5 gram dan dilarutkan dalam aquadest sebanyak 5 mL, sehingga diperoleh larutan stok

100% b/v, yang setara dengan 1000 mg/mL. Larutan stok tersebut kemudian dibuat seri konsentrasi sebesar 600 mg/mL; 700 mg/mL; 800 mg/mL dan 900 mg/mL. Larutan stok dipipet dengan cara mengambil masing masing 600 μL, 700 μL, 800 μL dan 900 μL dari larutan stok lalu ditambahkan dengan aquadest masing masing hingga 1 mL. Perhitungan pembuatan seri konsentrasi fraksi air ekstrak etanol daun johar dapat dilihat pada lampiran 3. Larutan uji yang digunakan untuk pengujian antibakteri dipipet sebanyak 10 μL dalam *paperdisk*.

f. Uji Aktivitas Antibakteri Metode Difusi Agar

Larutan uji dengan seri konsentrasi yang sudah dibuat, diteteskan sebanyak 10 μL pada *paperdisk* kemudian didiamkan hingga mengering. Suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* sebanyak 2,5 mL dicampur dengan 22,5 mL media MHA dalam keadaan hangat, digojog hingga homogen kemudian dituang ke dalam cawan petri. Media MHA tersebut didiamkan beberapa saat hingga media membeku. *Paperdisk* yang mengandung larutan uji kemudian diletakkan di permukaan media MHA. Kontrol positif yang digunakan kloramfenikol 30 μg/disk dan kontrol negatif yang digunakan adalah aquadest, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hal yang sama diterapkan juga terhadap bakteri *Escherichia coli*.

B. Analisis Data

1. Uji aktivitas antibakteri

Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif dari hasil pengukuran Diameter Derah Hambat (DDH) yang terbentuk pada zona hambat. Zona hambat adalah daerah jernih yang terbentuk di sekitar *paperdisk*. Terbentuknya zona hambat di sekitar *paperdisk* menandakan adanya aktivitas antibakteri. Tipe zona terbagi menjadi zona radikal dan zona iradikal. Zona radikal adalah zona disekitar *paperdisk* yang sama sekali tidak terlihat pertumbuhan bakteri, sedangkan zona iradikal adalah zona disekitar *paperdisk* yang pertumbuhan bakterinya dihambat oleh zat antimikroba tetapi tidak dimatikan.

2. Skrining fitokimia secara Uji Tabung

a. Flavonoid

Sampel dengan hasil positif flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna oranye, merah muda, merah hingga ungu dengan penambahan amil alkohol, serbuk Mg dan HCl pekat (Sarker dkk, 2006).

b. Alkaloid

Hasil positif senyawa alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna putih sampai kekuningan pada pereaksi Mayer, endapan berwarna cokelat pada pereaksi Wagner dan endapan berwarna jingga hingga kecokelatan pada pereaksi Dragendroff (Sarker dkk, 2006).

c. Tanin

Senyawa tanin dengan hasil positif ditandai dengan terbentuknya endapan setelah penambahan NaCl 1% dan gelatin 5% (Sarker dkk, 2006).

d. Saponin

Hasil positif senyawa saponin ditandai dengan terbentuknya buih yang bertahan selama kurang lebih 15 menit atau lebih setelah penggojokan dengan aquadest (Sarker dkk, 2006).

3. Identifikasi golongan senyawa aktif secara KLT

Identifikasi golongan senyawa aktif secara KLT dilakukan dengan melihat plat KLT hasil elusi yang telah diberikan penampak bercak, berdasarkan warna yang terbentuk pada spot dan kesesuaian bercak senyawa uji dengan pembanding. Identifikasi senyawa alkaloid menggunakan penampak bercak Dragendorff akan menghasilkan bercak berwarna jingga. Identifikasi tannin akan memberikan bercak berwarna kehitaman dengan pereagen FeCl₃ dan pereaksi anisaldehid-asam sulfat akan memberikan bercak berwarna biru sampai biru violet, merah, kuning, biru tua, ungu, hijau, atau berupa kuning coklat. Setelah itu, dihitung nilai Rf pada masing masing bercak dan dibandingkan dengan pembanding yang digunakan.

HALAMAN INI TIDAK TERSEDIA BAB III DAPAT DIAKSES MELALUI UPT PERPUSTAKAAN UNWAHAS

BAB IV. KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan, antara lain :

- 1. Fraksi air dari ekstrak etanol daun johar (*Cassia siamea* Lamk.) dapat menghambat bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.
- 2. Hasil KLT dari fraksi air ekstrak etanol daun johar mengandung alkaloid, tanin, saponin.

B. Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai aktivitas antibakteri fraksi air ekstrak etanol daun johar terhadap kelompok bakteri lain yang termasuk dalam bakteri patogen.

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, **2**,24.
- Agustina, 2016, Skrining Fitokimia Tanaman Obat di Kabupaten Bima, STKIP Bima, *Indonesian E-Journal of Applied Chemistry*, **4**, 74-75.
- Anggreany, R., T, Rahmawati, I., Leviana, F., Uji Antibakteri Ekstrak Dan Fraksi Herba Ceplukan (*Physalis Angulata L.*) untuk Mengatasi Infeksi *Staphylococcus epidermidis* Selama Persalinan, *Dinamika Kesehatan Jurnal Kebidanan dan Keperawatan*, Universitas Setia Budi Surakarta, 1, 260.
- Ansel, A.H., 1989, *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi*, *Edisi IV*, Universitas AsAyifaa, 131-136.
- BPOM, 2008, Informatorium Obat Nasional Indonesia, Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia, Jakarta, 75-80.
- Car, J., H, 2016, Bacteria in Photos *Escherichia coli* Electron Microscopy, data diperoleh melalui situs internet : http://www.bacteriainphotos.com/Escherichia%20coli%20electron%20m icroscopy.html, diunduh pada tanggal 22 Februari 2021.
- Car,J., H, 2016, Bacteria in Photos *Staphylococcus aureus* Electron Microscopy, data diperoleh melalui situs internet : http://www.bacteriainphotos.com/Staphylococcus%20aureus%20electron%20microscopy.html, diunduh pada tanggal 22 Februari 2021.
- Depkes R.I., 1994, Persyaratan Obat Tradisional, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta, 122-123.
- Depkes RI., 2000, Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan, *Jilid I*, Direktorat Jendral POM, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta, 3-11.
- Depkes RI.,1989, Materia Medika Indonesia, *Jilid V*, Direktorat Jendral POM,Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta, 194-197.
- Dey, P.M., 2012, Methods in Plant Biochemistry. Vol I. USA: Academic Press, 81-82.
- Djide., dan Sartini., 2008, *Dasar Dasar Mikrobiologi Farmasi*, Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Hasanudin Makasar, 73-74.

- Doss, A., Mubarack, H.M., dan Dhanabalan, R., 2009, Antibacterial Activity of Tannins from the Leaves of *Solanum trilobatum* Linn., *Indian Journal of Science and Technology*, RVS College of Arts and Science, Coimbatore, Tamilnadu, India, 2, 41-43.
- Doughari J. H dan Okafor N. B., 2008., Antibacterial Activity of *Senna siamae* Leaf Extracts on *Salmonella typhi*, *African Journal of Microbiology Research*, Federal University of Technology, Nigeria, 2, 042-046.
- Febriani, N,W., 2014, Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol dan Fraksi-Fraksi Dari Ekstrak Etanol Daun Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Bacillus subtilis* Serta Profil KLTnya, *Skripsi*, Universitas Muhammadiyah Surakarta Surakarta, **1**, 8-11.
- Fitri, A., Wiranto, A., Hawaidah, N., Lestari, D.E., Nurhidayati, A., dan Jut, A.,2014, Peralatan Sterilisasi Dan Media Pertumbuhan Mikroba, *Jurnal Praktikum Mikrobiologi Dasar*,1,1-7.
- Fitriah., Mappiratu1., dan Prismawiryanti., 2017, Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Tanaman Johar (*Cassia siamea* Lamk.) dari BerbagaiTingkat Kepolaran Pelarut, *Jurnal*, Universitas Todulako, 3(3):242-25.
- Gandjar, I. G. dan Rohman, A., 2007, *Kimia Farmasi Analisis*, Pustaka Pelajar, Yogyakarta, 25.
- Gritter, R.J, Bobbic, J.N., dan Schwarting, A.E., 1991, *Pengantar Kromatografi*, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata, Edisi II, ITB Press Bandung, 107.
- Handayani. R., dan Natasia. G., 2018., Uji Daya Hambat Ekstrak Etanol Daun Sangkareho (*Callicarpa Longifolia Lam.*) Terhadap *Escherichia Coli.Jurnal Surya Medika*, Universitas Muhammadiyah Palangkaraya, 3, 25.
- Harborne, J.B., 1987, Metode Fitokomia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan, Edisi ke-2, ITB, Bandung, 106-107.
- Harborne, J.B., 1996, Metode Fitokomia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan, Edisi ke-3, ITB, Bandung, 238-240.
- Harborne, J.B., 2006, Metode Fitokomia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan, Edisi ke-2, ITB, Bandung.

- Herli, M., A dan Wardaniati, I., 2019, Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol dan Fraksi Daun Ketapang yang Tumbuh di Sekitar Univ. Abdurrab, Pekanbaru, *Journal Of Pharmacy & Science*, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Abdurrab, **2**, 39.
- Heyne, K., 1987, *Tumbuhan Berguna Indonesia*, *Edisi ke-2*, Yayasan Sarana Wana Jaya, Indonesia, Jakarta, 515, 616-619.
- Hidayah, N., Huda, C., dan Tilarso, D,P., 2020, Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Daun Biduri (Calotropis gigantean L.) Terhadap *Staphylococcus aureus*, *JOPS (Journal Of Pharmacy and Science*), STIKes Karya Putra Bangsa Tulungagung, **4**, 40-45.
- Indriyani, T., dan Wulandari, Y., 2015, Pengolahan Daun Johar, *Seminar Nasional Sains dan Teknologi Terapan III*, Institut Teknologi Adhi Tama, Surabaya, **1**, 370.
- Ismail, D., 2012, Uji Bakteri *Escherichia coli* Pada Minuman Susu Kedelai Bermerek Dan Tanpa Merek Di Kota Surakarta, *skripsi*, Universitas Muhammadiyah Surakarta, 20-23.
- Jawetz, E., Melnick, J. L., Adelberg, E. A., 1986, *Mikrobiologi Kedokteran*, Penerbit Salemba Medika, Jakarta, 205-209.
- Jawetz, E., Melnick, J. L., Adelberg, E. A., 1996, *Mikrobiologi Kedokteran*, EGC, Jakarta, 213.
- Jawetz, E., Melnick, J. L., Adelberg, E. A., 2007, *Mikrobiologi Kedokteran*, EGC, Jakarta, 209.
- Kannabiran, K., Thanigairassu, R,R., Khanna, V,G., 2008, Antibacterial Activity of Saponin Isolated from the Leaves of *Solanum trilobatum* Linn, *Journal of Applied Biological Sciences*, Chemical and Biomedical Engineering VIT University, India, **2**,110.
- Kristianti, A.N., Aminah, N.S., Tanjung, M. dan Kurniadi, B., 2008. *Buku Ajar Fitokimia*. Surabaya: Jurusan Kimia Laboratorium Kimia Organik FMIPA Universitas Airlangga, 19-20.
- Lenny, S, 2006, Isolasi dan Uji Biokativitas Kandungan Kimia Utama Puding Merah dengan Metode Uji Brine Shrimp, *Skripsi*, Sumatera Utara: Universitas Sumatera Utara, 23-24.
- Mahatriny, N. N., Payani, N. P. S., Oka, I. B. M., Astuti, K. W., 2013, Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Daun Pepaya (*Carica papaya* L.) yang diperoleh Dari Daerah Ubud, Kabupaten Gianyar, Bali Universitas Udayana, 16-17.

- Mehta, J.P., Parmar, H. P., dan Vadia, S.H., 2014, Separation of Phytochemicals from Leaf of *Cassia siamea* and their Antimicrobial Assay, *The Journal of Phytochemistry*, Maharaja Krishnakumarsinhji havnagar University, India, 293.
- Mulangsri, D.A.K., Laksanasari, R., Amaliyah, R., Fitri, A., dan Kusumadewi, A.P., 2019, Aktivitas Antibakteri Beberapa Fraksi Ekstrak Daun Jeruk Nipis(Citrus aurantifolia swingle) Terhadap Bakteri Escherichia coli dan Staphylococcus aureus, Jurnal Ilmiah Cendekia Eksata, Universitas Wahid Hasyim, 4:1, 2.
- Rafi, M., Heryanto, R dan Septyaningsih, D, A., 2017, Atlas Kromatografi Lapis Tipis Tumbuhan Obat Indonesia, Pusat Studi Farmaka, IPB,1, 21-22.
- Rezi, J., Andarwati, R., dan Fauzi, Z, I., 2014, Uji Aktivitas Antibakteri Rebusan Daun Sirsak (*Annona muricata L.*) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylcoccus aureus*, *Jurnal Ilmiah*, **8**, 263-266.
- Robinson, T., 1995, Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi, diterjemahkan olehKosasih, P., Edisi Keenam, ITB, Bandung, 72, 157, 198.
- Salamah, N., Rozak, M., dan Abror, M, A., 2017, Pengaruh Metode Penyarian Terhadap Kadar Alkaloid Total Daun Jembirit (*Tabernaemontana sphaerocarpa*. BL) dengan Metode Spektrofotometri Visible, *Pharmaciana*, Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta, 7, 1, 116.
- Sari, G,N,F., dan Turahman, T., 2018, Aktivitas Antibakteri Ekstrak dan Fraksi Daun Manggis (*Garcinia mangostana*)terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa,Prosiding Seminar Nasional Unimus*,Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi, **1**, 769.
- Sarker S.D., Latif Z., dan Gray A.I., 2006, Nat-ural products isolation. In: Sarker SD, Latif Z, & Gray AI, editors. Natural Products Isolation. 2nd ed. Totowa (New Jersey). Humana Press Inc. 18: 338-342.
- Seran.L.,Herak. R.,Missa. H., 2020., Pembuktian Kemampuan Anti Bakteri Ekstrak Daun dan Kulit Jarak Pagar (*Jatropha culcas*) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* Secara In Vitro Dalam Pembelajaran Dengan Metode PBL Terhadap Mahasiswa Semester VII, *jurnal*, Program Studi Pendidikan Biologi FKIP UNWIRA,Universitas Katolik Widya Mandira., 3,1,15.

- Smith., 2009, Determination Of Chemical Composition of *Senna-siamea* (Cassia Leaves), University of Ado Ekiti, Pakistan, *Journal of Nutrition* **8**, 119-121.
- Suhartini, 2009, Peran Konservasi Keanekaragaman Hayati dalam Menunjang Pembangunan yang Berkelanjutan, *Prosiding Seminar Nasional Penelitian*, Jurusan Pendidikan Biologi FMIPA Universitas Negeri Yogyakarta, 12-15.
- Talaro, K. P. 2008, Foundation in Microbiology: Basic Principles. Mc Graw HillHigher Education, New York, 205-209.
- Tenriugi, A.D.P., Azis.A., Riski.I.D., 2018., Potensi Krim Ekstrak Daun Johar (*Cassia siame*) Menghambat Pertumbuhan *Candida albicans*., Akademi Farmasi Yamasi Makassar, 1, 1-4.
- Todar Kenneth, 2020, Online Textbook of Bacteriology, didapat dari situ internet: *www.textbookofbacteriology.net*, diunduh pada tanggal 22 Februari 202.
- Usman, W., Jada, M,S., dan Muhammad, 2014, Crude Extracts of Leaf and Stem Bark of *Cassia siamea* have Invitro Antimicrobial Activity, *Open Journal Of Biochemistry*, University of Technology, Nigeria, 1, 45-46.
- Utomo, S.B., Fujiyanti, M., Lestari, W,P., dan Mulyani, S., 2018, Uji Aktivitas Antibakteri Senyawa C-4-Metoksifenilkaliks Resorsinarena Termodifikasi Hexadecyl trimethyl ammonium-Bromide Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*, JKPK (Jurnal Kimia Dan Pendidikan Kimia), Universitas Sebelas Maret, 3, 203
- Van Steenis, C.G.G.J., 2003, Flora, hal 233-236, P.T. Pradya Paramita, Jakarta.
- Venn, R.F., 2008, Principles and Practices of Bioanalysis, Edisi kedus, 23-25.
- Voigt, R., 1994, *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*, *Edisi Ke-5*, Diterjemahkan Oleh: Dr. Soendani Noerono, Gajah Mada University Press, Yogyakarta.
- Volk dan Wheeler. 1988. Mikrobiologi Dasar. Edisi Kelima. Jilid I. Penerbit Erlangga, Jakarta, 50-52.
- Wagner, H., Bladt, S., 1996, Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas, *Second Edition*, New York, 359, 362, 364.
- Wullur, A,C., Schaduw, J., Wardhani, A,N,K., 2012, Identifikasi Alkaloid Pada Daun Sirsak (Annona Muricata L.), *Jurnal Ilmiah Farmasi*, Poltekkes Manado, **3**, 55.