

**AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK METANOL DAUN KENIKIR
(*Cosmos caudatus* Kunth.) TERHADAP *Staphylococcus epidermidis*,
Pseudomonas aeruginosa, DAN BIOAUTOGRAFINYA**

**ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF METHANOL EXTRACT OF KENIKIR LEAVES
(*Cosmos caudatus* Kunth.) AGAINST *Staphylococcus epidermidis*,
Pseudomonas aeruginosa, AND ITS BIOAUTOGRAPHY**

Aminah Fitriana Hamka, Cita Hanif Muflihah*
Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta
***E-mail: chm641@ums.ac.id**

Abstrak

Infeksi merupakan penyakit yang paling umum menyebabkan tingginya angka kesakitan dan kematian. *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri yang dapat menimbulkan infeksi lokal maupun sistemik. Tujuan dari penelitian untuk menguji aktivitas antibakteri ekstrak metanol daun kenikir terhadap *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa* dan mengidentifikasi senyawa aktif yang bertanggung jawab terhadap aktivitas tersebut. Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan sokletasi menggunakan metanol pro analisis. Konsentrasi ekstrak yang digunakan adalah 2, 4, 6, dan 8 mg/disk. Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi disk. Hasil uji menunjukkan adanya aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa* pada konsentrasi 8 mg/disk dengan diameter zona hambat berturut-turut sebesar $16,63 \pm 0,50$ mm dan $10,5 \pm 0,5$ mm. Identifikasi golongan senyawa metabolit sekunder daun kenikir menggunakan KLT dengan fase diam silika gel dan fase gerak etil asetat : asam asetat glasial : air (100:11:26 v/v/v), hasil menunjukkan bahwa ekstrak daun kenikir mengandung senyawa fenolik dan flavonoid. Identifikasi senyawa yang berpotensi sebagai antibakteri dengan metode bioautografi kontak tidak menunjukkan adanya potensi antibakteri.

Kata Kunci: *Cosmos caudatus* K., *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, Antibakteri, Bioautografi.

Abstract

Infection is one of the most common disease that causes high morbidity and mortality. *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa* are bacteria that can cause local and systemic infections. The purpose of this study was to test the antibacterial activity methanol extract of kenikir leaves against *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa* bacteria and to identify the active compounds responsible for such activity. Extraction was done by soxhletation method using metanol pro analysis. The concentration of the extract used at this research were 2, 4, 6, and 8 mg/disc. Antibacterial activity test was performed by disc diffusion method. The test results showed that the strongest antibacterial activity against *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa* was found at a concentration of 8 mg/disc with the inhibition zone diameters of 16.63 ± 0.50 mm and 10.5 ± 0.5 mm, respectively. Thin layer chromatography of the extract was conducted in order to identify the secondary metabolites of leaves kenikir extract with silica gel as a stationary phase and ethyl acetate : glacial acetic acid : water (100:11:26 v/v/v) as a mobile phase, the results showed that the leaves kenikir extract contained phenolic and flavonoid compounds. Identification of compounds responsible for antibacterial activity was performed using contact bioautography method did not indicate any antibacterial activity.

Keywords: *Cosmos caudatus K.*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, Antibacterial, Bioautography.

PENDAHULUAN

Infeksi merupakan masalah kesehatan yang paling banyak ditemukan dalam kehidupan sehari-hari. Pada negara-negara berkembang, penyakit infeksi masih menjadi penyebab utama tingginya angka kesakitan (*morbidity*) dan angka kematian (*mortality*) di rumah sakit. Kasus infeksi biasanya disebabkan oleh beberapa mikroorganisme seperti bakteri, parasit, virus, dan jamur (Jawetz *et al.*, 2007). Infeksi bakteri merupakan penyebab utama lambatnya penutupan luka pada luka bakar, luka kulit kronis, luka traumatis dan penutupan luka primer (Augustine *et al.*, 2015).

Staphylococcus epidermidis dan *Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri yang sering menimbulkan infeksi pada manusia (Jawetz *et al.*, 2007). *Staphylococcus epidermidis* merupakan bakteri Gram positif yang sering ditemui pada jaringan kulit dan darah yang terkontaminasi (Jawetz *et al.*, 2007; Brecher and Hay, 2005). Menurut Nathwani *et al.* (2014) *Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri patogen yang dapat menyebabkan infeksi lokal maupun sistemik dengan manifestasi klinik yang berbeda-beda. *Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri Gram negatif yang dapat menginfeksi jaringan tubuh dan menyebabkan penyakit. *Pseudomonas aeruginosa* merupakan patogen nosokomial yang bersifat invasif dan toksigenik sehingga dapat mengakibatkan infeksi pada pasien ditandai dengan dengan penurunan daya tahan tubuh (Jawetz *et al.*, 2007).

Indonesia merupakan negara tropis yang memiliki keanekaragaman hayati terbesar nomor dua setelah Brazil. Jumlah tanaman di Indonesia diperkirakan lebih dari 300.000 dan sekitar 7.500 merupakan tanaman obat (Sutrisna, 2016). Menurut Pratama (2017) Indonesia sudah mengenal pengobatan tradisional sejak dahulu dan digunakan secara turun-temurun melalui tradisi lisan. Salah satu tanaman yang memiliki khasiat sebagai obat dan banyak dimanfaatkan oleh masyarakat Indonesia adalah kenikir. Kenikir merupakan tumbuhan yang memiliki berbagai manfaat, seperti antibakteri, antiinflamasi, antidiabetes, antioksidan, antihiperlipidemia, antihipertensi, dan mencegah osteoporosis (Chan *et al.*, 2016).

Hasil penelitian Sari *et al.*, (2018) diketahui bahwa ekstrak etanol dan beberapa fraksi daun kenikir (*Cosmos caudatus K.*) memiliki aktivitas antibakteri yang diuji dengan metode difusi agar terhadap *Shigella boydii* ATCC 12985, *Shigella dysenteriae* ATCC 13313, dan *Shigella flexneri* ATCC 12022 pada konsentrasi 10, 15, 20, 25 dan 30%. Aktivitas antibakteri terbesar pada konsentrasi ekstrak etanol daun kenikir 30% dengan diameter hambat 20,2 mm. Berdasarkan uji fitokimia ekstrak etanol daun kenikir mengandung alkaloid, flavonoid, fenolik, saponin dan steroid.

Penelitian lain membuktikan bahwa fraksi heksana, etil asetat, metanol-air dan ekstrak metanol daun kenikir (*Cosmos caudatus K.*) memiliki diameter zona hambat paling besar pada ekstrak metanol dibandingkan fraksi uji lainnya terhadap *Salmonella typhi* yaitu 7,75 mm. Hasil uji fitokimia dengan metode uji tabung, menunjukkan bahwa ekstrak daun kenikir, fraksi heksana dan etil asetat mengandung golongan senyawa flavonoid, saponin, dan polifenol. Sedangkan fraksi metanol-air hanya mengandung senyawa flavonoid dan polifenol saja (Noor *et al.*, 2020). Belum adanya penelitian terkait pengujian ekstrak metanol daun kenikir terhadap *Staphylococcus epidermidis*. Oleh karena itu, dilakukan penelitian ini dengan tujuan untuk

mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak metanol daun kenikir (*Cosmos caudatus* K.) terhadap *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa* dan mengidentifikasi senyawa aktif yang terkandung menggunakan KLT serta bioautografinya.

METODE

Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini berupa alat sokletasi, penangas air (Mammert), *rotary evaporator* (Stuart), oven (Mammert), autoklaf (Hirayama), *Laminar Air Flow* (LAF), inkubator (Mammert), *shaker inkubator*, *vortex*, neraca analitik (Ohaus), cawan petri, tabung reaksi, bunsen, erlenmeyer, gelas ukur, gelas beaker, *spreader glass*, tabung eppendorf, bejana, lemari pendingin, mikropipet 1000 μ L (Socorex), mikropipet 10 μ L (Socorex), lampu UV 254 nm, lampu UV 366 nm, dan kamera sebagai alat dokumentasi.

Bahan

Bahan yang digunakan berupa daun kenikir yang diperoleh dari Pasar Kleco, metanol P.A, aquades, natrium klorida (NaCl) 0,9% steril, *Brain Heart Infusion* (BHI), *Mueller Hinton Agar* (MHA), *Mannitol Salt Agar* (MSA), *Mac Conkey Agar* (MCA), *Dimetil sulfoksida* (DMSO), standart 0,5 McFarland, silika gel GF₂₅₄, cakram kosong, cakram antibiotik Ciprofloxacin 5 μ g, Cotrimoxazol 25 μ g, Gentamisin 10 μ g, Tetrasiklin 30 μ g, bakteri *Staphylococcus epidermidis* dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Farmasi USB, bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dari kultur biakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Farmasi UMS dan reagen semprot Sitroborat, Amonia, Dragendorff, FeCl₃, AlCl₃.

Metode Penelitian

Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat gelas dicuci bersih dan dikeringkan untuk dilakukan sterilisasi. Tabung reaksi dan cawan petri dibungkus kertas selanjutnya disterilisasi menggunakan oven pada suhu 160-171°C selama 1 jam. Ose bulat, pinset dan *spreader glass* disterilkan dengan membakar ujung alat di atas nyala api bunsen sampai berpijar. Tabung eppendorf, *blue tip*, *yellow tip*, media MHA, MSA, MCA, NaCl 0,9% yang telah larut dilakukan sterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121 °C (Andrian, 2016).

Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman kenikir (*Cosmos caudatus* K.) dilakukan untuk menetapkan kebenarannya sesuai ciri-ciri morfologi berdasarkan panduan buku *FLORA Untuk Sekolah di Indonesia* karangan Dr C.G.G.J Van Steenis (1981). Proses determinasi dilakukan di Laboratorium Morfologi Sistematis Tumbuhan Universitas Setia Budi.

Pembuatan Ekstrak

Sebanyak 1 kilogram daun kenikir segar dicuci bersih kemudian dikeringkan menggunakan oven pada suhu 50°C selama 8 jam. Selanjutnya 100 gram serbuk daun dibungkus dengan kertas saring, diikat menggunakan benang, dimasukkan dalam tabung soklet dan ditambah metanol PA dengan volume minimal 2 kali sirkulasi. Sokletasi dilakukan dalam waktu kurang dari 24 jam pada suhu 65°C dan dihentikan ketika pelarut pada tabung soklet tidak berwarna lagi. Ekstrak cair kemudian dilakukan pemekatan menggunakan *rotary evaporator* dan pemekatan lebih lanjut di atas penangas air (Sia *et al.*, 2020).

Pembuatan Media

Serbuk media *Mueller Hinton Agar* (MHA) ditimbang sebanyak 3,8 gram, *Mannitol Salt Agar* (MSA) ditimbang sebanyak 11,1 gram dan *Mac Conkey Agar* (MCA) ditimbang sebanyak 5,2 gram masing-masing media dilarutkan dengan 100 ml aquades dalam erlenmeyer. Agar tercampur sempurna medium dipanaskan di atas *hot plate*. Erlenmeyer ditutup menggunakan aluminium foil dan diikat menggunakan karet kemudian disterilkan menggunakan autoklaf

pada suhu 121°C selama 15 menit. Media dituang dalam cawan petri steril sebanyak 20 ml ditunggu hingga media memadat dan dilakukan dalam LAF (Noor *et al.*, 2020).

Kultur dan Pembuatan Suspensi Bakteri

Kultur bakteri dilakukan dengan mengambil bakteri sebanyak 1 ose digoreskan pada media MSA untuk bakteri *S epidermidis* dan MCA untuk bakteri *P aeruginosa* dengan metode streak plate secara zig zag selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Pembuatan suspensi bakteri dengan mengambil 3-5 koloni bakteri menggunakan ose steril kemudian disuspensikan dalam tabung reaksi yang berisi 5 ml BHI cair. Kemudian diinkubasi menggunakan shaker inkubator selama 24 jam. Hasil inkubasi diambil sebanyak 200 µL dan kekeruhan disamakan dengan standart Mc Farland dengan penambahan NaCl 0,9% (Nurwaini and Savitri, 2020).

Pembuatan Konsentrasi Ekstrak

Ekstrak daun kenikir diambil untuk membuat larutan stok 100% dengan menimbang 2 gram ekstrak dan dilarutkan dalam 2 ml DMSO. Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan menggunakan konsentrasi larutan 800 mg/ml, 600 mg/ml, 400 mg/ml dan 200 mg/ml. Pengenceran ekstrak dilakukan menggunakan rumus $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$ (Yacob and Endriani, 2010). Konsentrasi 800 mg/ml dibuat dengan cara mengambil 0,8 ml ekstrak dari larutan stok kemudian dicukupkan dengan DMSO hingga 1 ml dalam tabung eppendorf. Pada konsentrasi 600 mg/ml, 400 mg/ml dan 200 mg/ml dilakukan hal sama dengan mengambil dari larutan stok berturut-turut sebanyak 0,6 ml; 0,4 ml dan 0,2 ml dan dicukupkan dengan DMSO hingga 1 ml. Cakram kosong diteteskan masing-masing konsentrasi ekstrak sebanyak 10 µL. Pada akhir pembuatan larutan didapatkan konsentrasi sebesar 2, 4, 6 dan 8 mg/disk.

Uji Sensitivitas Bakteri

Permukaan media MH diinokulasi dengan 200 µL bakteri uji diratakan dengan *spreader glass* pada seluruh permukaan agar. Cakram antibiotik yang digunakan adalah Ciprofloxacin 5 µg, Cotrimoksazole 25 µg, Gentamisin 10 µg, dan Tetrasiklin 30 µg. Diameter zona hambat diukur dan dihitung, diameter terbesar digunakan sebagai kontrol positif untuk uji aktivitas antibakteri.

Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi disk dengan media *Mueller Hinton* (MH). Suspensi bakteri diambil sebanyak 200 µL kemudian diratakan ke seluruh permukaan media agar, diamkan hingga permukaan mengering sekitar 5-10 menit. Selanjutnya ekstrak metanol daun kenikir dalam konsentrasi 800 mg/ml, 600 mg/ml, 400 mg/ml dan 200 mg/ml diteteskan pada cakram kosong masing-masing 10 µL, ditunggu cakram mengering selama 30 menit kemudian cakram ditempel pada media agar yang telah diinokulasi dengan bakteri uji. Media diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Sia *et al.*, 2020). Kontrol negatif yang digunakan adalah DMSO dan kontrol positif Ciprofloxacin 5 µg. Aktivitas antibakteri diidentifikasi dengan mengukur diameter zona hambat yang terbentuk.

Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Pemisahan senyawa ekstrak metanol daun kenikir menggunakan plat silika sebagai fase diam dengan ukuran 1,5 × 8 cm. Selanjutnya diberi tanda pada tepi atas dan bawah plat dengan jarak 1 cm sebagai penentu posisi awal penotolan dan batas akhir proses elusi. Plat silika diaktivasi dengan cara dipanaskan pada suhu 105°C selama 10 menit. Fase gerak dijenuhkan dalam chamber dengan menggunakan kertas saring hingga kertas saring terbasahi semua (Paputungan *et al.*, 2019). Fase gerak yang digunakan adalah etil asetat : asam asetat glasial : air dengan perbandingan 100 : 11 : 26 v/v/v dalam 2 ml larutan campuran. Ekstrak metanol daun kenikir dengan konsentrasi 0,1% ditotolkan sebanyak 4 µL pada plat silika gel GF₂₅₄, kemudian dielusi dengan fase gerak yang sudah dijenuhkan. Plat hasil elusi diamati pada UV 254 nm dan 366 nm, kemudian dihitung nilai Rf nya (Putra *et al.*, 2020). Hasil elusi diidentifikasi dengan menyemprot reagen Dragendorff, Amonia, FeCl₃ dalam air, Sitroborat, AlCl₃.

Uji Bioautografi

Kromatogram hasil pemisahan senyawa ditempelkan pada media MHA yang telah diinokulasi dengan bakteri uji, ditunggu selama 30 menit untuk sampel dapat berdifusi pada media padat, lempeng kromatogram diangkat dan dikeluarkan dari media. Selanjutnya media diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Papatungan *et al.*, 2019). Hasil yang diamati yaitu zona jernih yang terbentuk dicawan petri pada Rf senyawa yang terbentuk dari hasil elusi KLT.

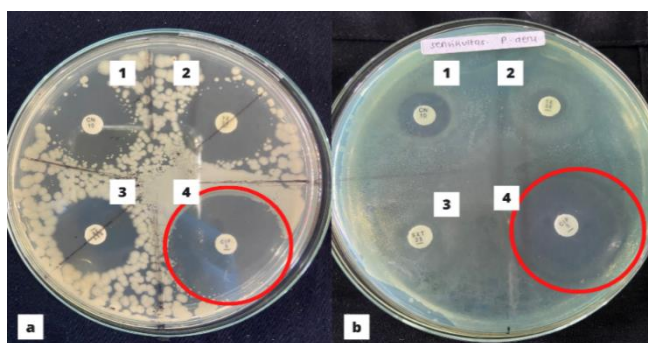
HASIL DAN PEMBAHASAN

Determinasi bertujuan untuk memastikan bahwa sampel yang dipakai sesuai dengan ciri morfologinya untuk menghindari kesalahan pada jenis tanaman yang dipakai. Bagian tumbuhan yang diuji determinasinya adalah akar, batang, daun dan bunga. Hasil determinasi menunjukkan bahwa tumbuhan yang diteliti merupakan spesies *Cosmos caudatus* Kunth. yang termasuk dalam famili *Asteraceae*.

Ekstraksi merupakan proses yang bertujuan untuk memisahkan suatu zat dari campurannya. Pelarut yang digunakan adalah metanol pro analisis. Ekstrak kental yang diperoleh sebesar 16,58 gram dari 106,83 gram serbuk daun kenikir sehingga diperoleh rendemen sebesar 15,52%.

Hasil Uji Sensitivitas

Uji sensitivitas bakteri dilakukan dengan mengamati sensitivitas bakteri uji terhadap antibiotik yang digunakan. Antibiotik yang menghasilkan diameter zona hambat paling besar terhadap bakteri uji akan digunakan sebagai kontrol positif pada pengujian antibakteri terhadap ekstrak metanol daun kenikir. Pada penelitian ini antibiotik yang digunakan adalah Ciprofloxacin 5 µg, Cotrimoksazole 25 µg, Gentamisin 10 µg dan Tetrasiklin 30 µg. hasil pengamatan uji sensitivitas dilakukan dengan membandingkan diameter zona hambat terbesar dengan standar kepekaan antibiotik.



Gambar 1. Hasil uji sensitivitas bakteri (a) *S. epidermidis* dan (b) *P. aeruginosa* terhadap antibiotik 1) Gentamisin 10 µg menghasilkan zona bening 18,5 dan 14 mm, 2) Tetrasiklin 30 µg menghasilkan zona bening 22 dan 10 mm, 3) Cotrimoxazol 10 µg menghasilkan zona bening 20 dan 10,5 mm dan 4) Ciprofloxacin 5µg menghasilkan zona bening 29 dan 28 mm

Berdasarkan hasil pengamatan pada Tabel 1 menunjukkan bahwa antibiotik ciprofloxacin 5 µg menghasilkan zona hambat yang paling besar pada bakteri *S. epidermidis* dan *P. aeruginosa* dengan diameter masing-masing sebesar 29 mm dan 28 mm. Hasil uji sensitivitas disesuaikan dengan standar uji kepekaan pada CLSI (2020). Berdasarkan Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2020), Ciprofloxacin 5 µg dikategorikan sensitif pada bakteri *S. epidermidis* karena diameter zona hambatnya ≥ 21 mm sedangkan pada bakteri *P. aeruginosa* diameter zona hambat yang terbentuk ≥ 25 mm. Berdasarkan hasil tersebut

antibiotik ciprofloxacin dipilih sebagai kontrol positif karena memiliki diameter zona hambat yang paling besar.

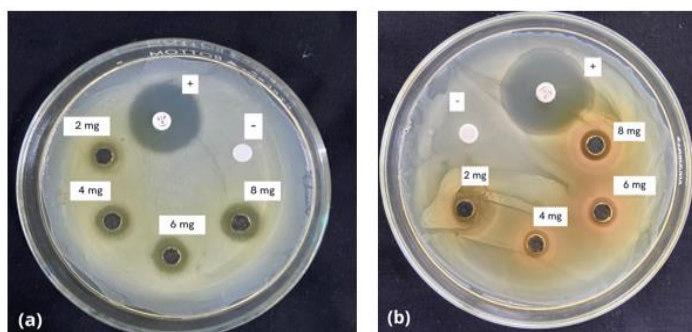
Tabel 1. Hasil uji sensitivitas antibiotik terhadap bakteri *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa* (CLSI, 2020)

Bakteri	Antibiotik	Standart kepekaan (mm)			Hasil	
		Sensitif	Intermediate	Resisten	Diameter zona hambat (mm)	Keterangan
S. <i>epidermidis</i>	Ciprofloxacin 5 µg	≥ 21	16-20	≤ 15	29	Sensitif
	Cotrimoxazol 25 µg	≥ 16	11-15	≤ 10	20	Sensitif
	Gentamisin 10 µg	≥ 15	13-14	≤ 12	18,5	Sensitif
	Tetrasiklin 30 µg	≥ 19	15-18	≤ 14	22	Sensitif
P. <i>aeruginosa</i>	Ciprofloxacin 5 µg	≥ 25	16-24	≤ 18	28	Sensitif
	Cotrimoxazol 25 µg	-	-	-	9,5	
	Gentamisin 10 µg	≥ 15	13-14	≤ 12	14	Intermediate
	Tetrasiklin 30 µg	≥ 19	15-18	≤ 14	10	Intermediate

Keterangan : Diameter termasuk diameter disk 6 mm

Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak

Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi disk yaitu pengujian sensitivitas bakteri dengan menggunakan kertas cakram terhadap suatu zat tertentu yang memiliki aktivitas antibakteri (Amalia *et al.*, 2014). Prinsip kerja pengujian ini yaitu terbentuknya *clear zone* yang berarti hambatan pertumbuhan bakteri oleh ekstrak pada permukaan media yang telah ditanami bakteri. Metode *disc diffusion* dipilih karena memiliki kelebihan seperti pelaksanaan yang mudah dan praktis sebab tidak menggunakan peralatan khusus dan lebih sesuai dengan sampel yang berbentuk ekstrak cair (Azizah and Artanti, 2019). Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak metanol daun kenikir dilakukan pada konsentrasi 2, 4, 6, dan 8 mg/disk.



Gambar 2. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak metanol daun kenikir terhadap bakteri (a) *Staphylococcus epidermidis* dan (b) *Pseudomonas aeruginosa*

Uji aktivitas antibakteri dalam penelitian ini menggunakan DMSO 100% sebagai kontrol negatif dan pembuatan konsentrasi ekstrak. DMSO dipilih sebagai pelarut karena mampu melarutkan senyawa polar dan non polar (Noor *et al.*, 2020). Kontrol negatif digunakan untuk mengetahui apakah pelarut berpengaruh terhadap pertumbuhan bakteri uji sehingga zona

hambat yang terbentuk pada uji aktivitas ekstrak berasal dari senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak daun kenikir bukan berasal dari pelarut (Dwiyanti *et al.*, 2014). Kontrol positif yang digunakan sesuai hasil uji sensitivitas yang memiliki diameter zona hambat paling besar dan sensitif yaitu ciprofloxacin 5 µg. Hasil uji aktivitas ekstrak metanol daun kenikir terhadap bakteri uji dilakukan replikasi sebanyak 3 kali untuk mendapatkan hasil uji yang akurat.

Tabel 2. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak metanol daun kenikir

Bakteri	Diameter zona hambat (rerata ± SD mm)					
	Konsentrasi ekstrak (mg/disc)				K +	K -
	2	4	6	8	Ciprofloxacin 5 µg/disc	DMSO
<i>S.epidermidis</i>	7,63 ± 0,50	10,63 ± 0,76	12,75 ± 1,00	16,63 ± 0,50	29,33 ± 0,58	6,0 ± 0,0
<i>P.aeruginosa</i>	6,0 ± 0,0	6,0 ± 0,0	6,0 ± 0,0	10,5 ± 0,5	28,0 ± 1,0	6,0 ± 0,0

Keterangan : Diameter termasuk diameter disk 6 mm

Berdasarkan hasil pengamatan dari Tabel 2 ekstrak metanol daun kenikir pada bakteri *Staphylococcus epidermidis* menghasilkan zona hambat terbesar pada konsentrasi 8 mg/disk dengan diameter zona hambat rata-rata sebesar 16,63 ± 0,50 mm. Besarnya konsentrasi ekstrak yang dipakai mempengaruhi semakin besar pula zona hambat yang terbentuk. Hal ini sesuai dengan penelitian Angelina *et al.*, (2015) pada ekstrak etanol daun kemangi, semakin tinggi konsentrasi ekstrak etanol daun kemangi menghasilkan tinggi pula daya hambat yang terbentuk menandakan semakin banyak senyawa aktif yang terkandung didalamnya sehingga mampu menghambat pertumbuhan bakteri. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak metanol daun kenikir terhadap *Pseudomonas aeruginosa* menunjukkan adanya zona hambat hanya pada konsentrasi 8 mg/disk dengan rerata diameter zona hambat sebesar 10,5 ± 0,5 mm.

Hasil uji statistik menunjukkan bahwa data uji ekstrak terhadap bakteri *S epidermidis* berdistribusi normal dengan nilai signifikansi $p > 0,05$ (0,20). Hasil data uji homogen dengan nilai signifikansi $p > 0,05$ (0,275). Kemudian dilanjutkan dengan uji ANOVA *one way test*. Berdasarkan hasil analisis statistik bahwa terdapat pengaruh perbedaan konsentrasi ekstrak metanol daun kenikir terhadap besarnya zona hambat pada pertumbuhan bakteri *S epidermidis* dengan signifikansi $0,00 < P$ (0,05).

Hasil uji statistik menunjukkan bahwa data uji ekstrak metanol daun kenikir terhadap bakteri *P aeruginosa* tidak terdistribusi normal dengan nilai signifikansi $0,01 < p$ (0,05). Data uji homogen ditandai dengan nilai signifikansi $0,171 > P$ (0,05). Kemudian dilanjutkan dengan uji *Kruskal wallis*, didapatkan hasil bahwa terdapat pengaruh perbedaan konsentrasi ekstrak daun kenikir terhadap besarnya zona hambat pada pertumbuhan bakteri *P aeruginosa* dengan nilai signifikansi $0,024 < P$ (0,05).

Ekstrak metanol daun kenikir menunjukkan adanya hambatan pertumbuhan bakteri yang lebih besar terhadap bakteri Gram positif (*S epidermidis*) dibandingkan dengan bakteri Gram negatif (*P aeruginosa*), hal ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan aktivitas antibakteri pada komponen penyusun dinding sel pada kedua bakteri uji. Menurut Amalia *et al.*, (2014) *Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri Gram negatif yang memiliki dinding sel yang kompleks dan berlapis tiga sehingga senyawa antimikroba lebih sulit untuk masuk ke dalam sel bakteri.

Hasil uji KLT

KLT merupakan proses pemisahan senyawa yang terkandung dalam ekstrak metanol daun kenikir. Kelebihan dari metode KLT yaitu peralatan yang digunakan sederhana, murah, waktu analisis cepat dan memiliki daya pisah yang baik (Wardhani and Sulistyani, 2012). Fase diam yang digunakan adalah plat silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak etil asetat : asam asetat glasiat : air dengan perbandingan (100:11:26 v/v/v). Eluen dibuat jenuh pada chamber untuk menyamakan tekanan uap yang ada dalam chamber (Putra *et al.*, 2020). Ekstrak daun kenikir dibuat dengan konsentrasi 0,1% dengan 4 kali penotolan pada setiap plat. Reagen semprot yang digunakan yaitu Dragendroff, Amonia, FeCl₃ dalam air, Sitoborat, AlCl₃. Nilai Rf yang diperoleh digunakan untuk mengidentifikasi senyawa aktif pada ekstrak.

Pengamatan hasil pemisahan dilakukan pada sinar tampak, UV 254 nm, UV 366 nm. Pada pengamatan sinar UV 254 plat silika akan memancarkan cahaya sedangkan sampel akan tampak berwarna gelap sedangkan UV 366 nm menghasilkan bercak noda yang berfluoresensi dengan latar belakang yang gelap. Hal tersebut disebabkan oleh plat silika gel GF₂₅₄ yang dapat berfluoresensi pada panjang gelombang 254 nm karena adanya gugus penghasil warna pada noda (Husna and Mita, 2020).

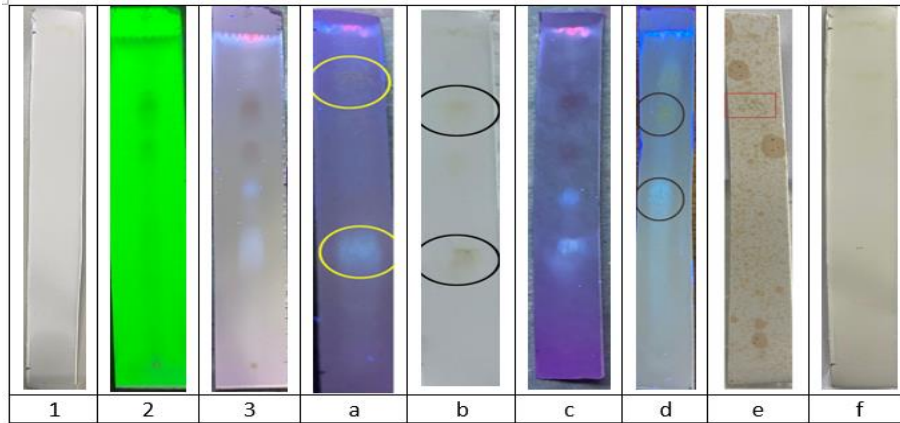
Tabel 3. Hasil uji KLT ekstrak metanol daun kenikir

Plat	RF	UV		Sitoborat	Amonia	AlCl ₃	FeCl ₃	Dragendroff	Keterangan	
		254	366	UV366	VIS	UV 366	UV366	VIS		VIS
b	0,34	P	B	B	K	B	-	-	-	(+) Flavonoid
a	0,45	P	B	-	-	-	B	-	-	(-) Flavonoid
d	0,61	K	K	KU	-	-	KU	-	-	(+) Flavonoid
e	0,77	K	K	KU	-	-	-	K	-	(+) Fenolik, Flavonoid

Keterangan :

B = Biru, K = Kehitaman. KU = Kuning, P = Pemadaman bercak

Identifikasi senyawa flavonoid dengan menggunakan uap amonia menghasilkan bercak berwarna kekuningan. Pada pengamatan UV 366 nm bercak berwarna biru sebelum penguapan amonia dan tetap berwarna biru setelah penguapan amonia. Berdasarkan hal tersebut jenis flavonoid yang mungkin terkandung pada bercak yaitu isoflavon yang tidak mengandung 5-OH bebas (Markham, 1988). Hasil penyemprotan amonia pada Rf 0,34 mengalami perubahan berwarna kuning pada pengamatan sinar tampak dan tetap berfluoresens biru pada UV 366 nm. Hasil penyemprotan sitoborat pada nilai Rf 0,34 tidak mengalami perubahan warna menjadi kuning hingga hijau tetapi menghasilkan bercak warna biru, sedangkan pada Rf 0,61 dan 0,77 mengalami perubahan warna menjadi kuning pada hasil KLT yang dapat dilihat pada Gambar 3. Penyemprotan AlCl₃ akan menghasilkan fluoresensi kuning bila dilihat di bawah sinar UV 366 nm (Markham, 1988), pada Rf 0,61 menghasilkan perubahan warna bercak menjadi kuning pada pengamatan UV 366. Sehingga hasil uji KLT menegaskan bahwa dalam ekstrak metanol daun kenikir mengandung flavonoid pada Rf 0,34, 0,61 dan 0,77. Pada penelitian Ramadhan *et al.*, (2018) ekstrak daun kenikir mengandung 4 isolat yang positif mengandung flavonoid.



Gambar 3. Hasil uji KLT dengan fase diam silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak etil asetat:asam asetat glasial: air (100:11:26 v/v/v) pada pengamatan (1) sinar tampak, (2) sinar UV 254 nm, (3) UV 366 nm, dengan hasil penyemprotan (a) sitroborat pada pengamatan UV 366 nm, (b) amonia pada sinar tampak, (c) amonia pada UV 366 nm, (d) AlCl₃ pada pengamatan UV 366, (e) FeCl₃ pada pengamatan sinar tampak dan (d) Dragendorff pada pengamatan sinar tampak

Identifikasi senyawa fenol dengan pereaksi semprot FeCl₃ menunjukkan hasil positif spot yang berwarna hijau, ungu, biru atau hitam yang dilihat pada sinar tampak (Wagner and Blatt, 1996). Hasil bercak pada Rf 0,77 terdapat perubahan warna kehitaman ketika diamati pada sinar tampak yang dapat dilihat pada Gambar 3. Hasil KLT menegaskan bahwa dalam ekstrak metanol daun kenikir mengandung senyawa fenolik.

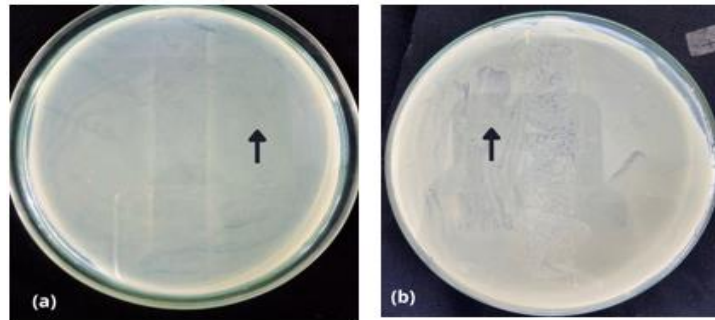
Reagen semprot dragendorff digunakan untuk mendeteksi senyawa alkaloid dengan hasil positif terdapat perubahan warna coklat atau orange-coklat yang dapat dilihat pada sinar tampak (Wagner and Blatt, 1996). Pada 4 bercak yang dihasilkan dari uji KLT tidak ada satupun yang menghasilkan perubahan menjadi warna kuning ataupun orange-kecoklatan ketika diamati pada sinar tampak yang dapat dilihat pada Gambar 3. Sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak metanol daun kenikir tidak mengandung senyawa alkaloid.

Hasil Uji Bioautografi

Metode yang digunakan adalah bioautografi kontak dengan menempelkan lempeng KLT di atas medium agar yang telah diinokulasikan dengan bakteri uji. Hasil uji dilihat dari adanya zona bening yang terbentuk pada bagian-bagian spot. Kekurangan dari metode kontak yaitu sulitnya untuk mendapatkan kontak yang optimal antara media agar dan kromatogram, sehingga memungkinkan untuk melekatnya matriks lempeng dan tertinggal pada media ketika kromatogram diangkat (Papatungan *et al.*, 2019). Beberapa senyawa dapat berikatan dengan matriks lempeng kromatogram terutama matriks yang berbahan silika sehingga beberapa senyawa tidak berdifusi ke dalam agar.

Berdasarkan hasil uji bioautografi tidak ditemukan adanya zona hambat di sekitar Rf 0,34, Rf 0,45, Rf 0,61 dan Rf 0,77 pada bakteri *S.epidermidis* dan *P. aeruginosa*. Pada uji KLT diidentifikasi ekstrak kenikir mengandung senyawa fenolik dan flavonoid yang berpotensi menghambat pertumbuhan bakteri. Namun pada uji bioautografi senyawa tidak mampu menghambat pertumbuhan bakteri disebabkan karena konsentrasi ekstrak yang digunakan sebesar 0,1% belum mampu untuk menghambat pertumbuhan bakteri *S.epidermidis* dan *P. aeruginosa*. Hal ini dapat juga disebabkan karena adanya efek sinergisme pada metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak metanol daun kenikir. Senyawa tunggal yang terpisah

belum mampu untuk menghambat pertumbuhan bakteri jika dibandingkan dengan aktivitas senyawa yang saling bersinergi (Christoper *et al.*, 2017).



Gambar 4. Hasil uji bioautografi ekstrak metanol daun kenikir terhadap bakteri (a) *S.epidermidis* dan (b) *P. aeruginosa*

KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun kenikir (*Cosmos caudatus* K.) memiliki potensi antibakteri dengan terbentuknya diameter zona hambat pada uji aktivitas antibakteri sedangkan tidak menunjukkan adanya potensi antibakteri pada uji bioautografi. Hal ini terjadi karena senyawa tunggal yang terpisah belum mampu untuk menghambat pertumbuhan bakteri jika dibandingkan dengan aktivitas senyawa aktif yang saling bersinergi. Pada uji KLT teridentifikasi senyawa fenolik dan flavonoid.

Berdasarkan hasil penelitian ini, disarankan untuk menggunakan pembanding kuersetin pada uji KLT untuk lebih mendapatkan hasil yang tepat. Identifikasi senyawa aktif yang memberikan aktivitas antibakteri secara KLT-Bioautografi pada ekstrak metanol daun kenikir dapat dilakukan dengan metode yang lain seperti bioautografi langsung dan overlay.

DAFTAR PUSTAKA

- Amalia S., Wahdaningsih S. and Untari E.K., 2014, Uji aktivitas antibakteri fraksi n-heksan kulit buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus* Britton & Rose) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*, 1 (2), 61–64.
- Andrian R., 2016, Pengenalan Alat-Alat Laboratorium Mikrobiologi Untuk Mengatasi Keselamatan Kerja dan Keberhasilan Praktikum, *Jurnal Mikrobiologi*, 1 (1)
- Angelina M., Turnip M. and Khotimah S., 2015, Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Kemangi (*Ocimum sanctum* L .) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*, *Jurnal Protobiont*, 4 (1), 184–189.
- Augustine H., Gillis J. and Williams J., 2015, *Pseudomonas aeruginosa* wound infections: a critical appraisal of Topical Antiseptics, *Dalhousie Medicine University*, 42 (1)
- Azizah R. and Artanti N., 2019, Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Dan Getah Pelelepah Serta Bonggol Pisang Kepok Kuning (*Musa paradisiaca* Linn) Terhadap Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Klebsiella pneumoniae* dengan Metode Difusi Agar, , 01, 29–38.
- Brecher M.E. and Hay S.N., 2005, Bacterial contamination of blood components, *Clinical Microbiology*, 18 (1), 4.
- Chan E.W.C., Wong S.K. and Chan H.T., 2016, Ulam herbs of *Oenanthe javanica* and *Cosmos caudatus*: An overview on their medicinal properties, *Journal of Natural Remedies*, 16 (4), 6–8.
- Christoper W., Natalia D. and Rahmayanti S., 2017, Artikel Penelitian Uji Aktivitas Antijamur Ekstrak Etanol Umbi Bawang Dayak (*Eleutherine americana* (Aubl .) Merr . Ex K . Heyne .) terhadap

- Trichophyton mentagrophytes* secara In Vitro, *Jurnal Kesehatan Andalas*, 6 (3), 685–689.
- CLSI, 2020, *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*,
- Dwiyanti W., Ibrahim M. and Trimulyono G., 2014, Pengaruh Ekstrak Daun Kenikir (*Cosmos caudatus*) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Bacillus cereus* secara In Vitro, *Lentera Bio Berkala Ilmiah Biologi*, 3, 1–5.
- Husna F. and Mita S.R., 2020, Identifikasi Bahan Kimia Obat Dalam Obat Tradisional Stamina Pria dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis, *Farmaka*, 18 (2), 16–25.
- Jawetz, Melnick and Aldeberg, 2007, *Mikrobiologi Kedokteran*, 23rd ed., Penerbit Buku Kedokteran EGC, Indonesia.
- Markham K., 1988, *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*, Penerbit ITB, Bandung.
- Noor A.S., Triatmoko B. and Nuri N., 2020, Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol dan Fraksi Daun Kenikir (*Cosmos caudatus* Kunth) terhadap *Salmonella typhi*, *Pustaka Kesehatan*, 8 (3), 4–6.
- Nurwaini, S., and Savitri A.I., 2020, Formulasi sediaan gel antiseptik tangan daun jambu mete (*Anacardium occidentale* L.), *Prosiding University Research Colloquium*, 95–105.
- Paputungan W.A., Lolo W.A. and Siampa J.P., 2019, Aktivitas antibakteri dan analisis KLT-bioautografi dari fraksi biji kopi robusta (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner), *PHARMACON*, 8 (3), 516–524.
- Pratama I.M.O., 2017, *Obat tradisional*, 2.
- Putra Y., Samirana and Andhini, 2020, Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Flavonoid Potensial Antioksidan dari Daun Binahong (*Anredera scandens* (L.) Moq.), 8 (2), 85–94.
- Ramadhan F., Mukarramah L., Yulian R. and Hilyatun N., 2018, Flavonoids from endophytic bacteria of *Cosmos caudatus* Kunth. leaf as anticancer and antimicrobial, *Asian Journal Of Pharmaceutical and Clinical Research*, 11 (1), 200–204.
- Sari E.R., Lely N. and Septimarleti D., 2018, Uji Aktivitas Antibakteri dari Ekstrak Etanol dan Beberapa Fraksi Daun Kenikir (*Cosmos caudatus* Kunth) terhadap Bakteri Penyebab Disentri *Shigella* sp, *Jurnal Penelitian Sains*, 20 (1), 4–5.
- Sia Y.S., Chern Z.W., Hii S.P., Tiu Z.B. and Arifin M.A., 2020, Antimicrobial Activity against Pathogenic Bacteria, Antioxidant and Cytotoxic Activity of *Cosmos caudatus*, *International Journal of Engineering Technology and Sciences (Ijets)*, 7 (1), 32–43. <http://dx.doi.org/10.15282/ijets.7.1.2020.1004>.
- Sutrisna E., 2016, *Herbal Medicine : Suatu Tinjauan Farmakologis*, Muhammadiyah University Press, Indonesia.
- Wagner and Blatt, 1996, *Plant drug analysis*. Springer, Berlin, Heidelberg
- Wardhani L.K. and Sulistyani N., 2012, Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etil Asetat Daun Binahong (*Anredera scandens* (L.) Moq) terhadap *Shigella flexneri* beserta profil kromatografi lapis tipis, *Jurnal Ilmiah Kefarmasian*, 2 (1), 1–16.
- Yacob T. and Endriani R., 2010, Daya Antibakteri Ekstrak Etanol Ketepeng Cina (*Senna alata*) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* secara In Vitro, 13 (65), 63–66.