

UJI ANTIBAKTERI EKSTRAK DAUN KIRINYUH (*Chromolaena odorata* L.) DAN DAUN SALAM (*Syzygium polyanthum*) TERHADAP *Pseudomonas aeruginosa* DAN *Bacillus subtilis*

ANTIBACTERIAL TEST OF KIRINYUH LEAF EXTRACT (*Chromolaena odorata* L.) AND BAY LEAF (*Syzygium polyanthum*) AGAINST *Pseudomonas aeruginosa* AND *Bacillus subtilis*

Eka Damayanti¹, Maryati Maryati^{1*}

¹Laboratorium Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta, Sukoharjo

*E-mail correspondence : maryati@ums.ac.id

Dikirim : 28 Januari 2025, Disetujui : 28 Februari 2025, Diterbitkan : 28 Februari 2025

Abstrak

Infeksi merupakan masalah kesehatan paling umum ditemui dalam kehidupan sehari-hari. Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Bacillus subtilis* merupakan bakteri yang dapat menimbulkan infeksi lokal maupun sistemik. Tujuan penelitian ini adalah menguji aktivitas antibakteri daun kirinyuh (*Chromolaena odorata* L.) dan daun salam (*Syzygium polyanthum*) terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Bacillus subtilis* dan mengidentifikasi golongan senyawa yang berperan sebagai agen antibakteri. Etanol 96% digunakan dalam maserasi ekstrak. Uji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi cakram. DMSO digunakan sebagai kontrol negatif, dan sampel yang diuji adalah ekstrak dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8, dan 10 mg/disk. Siprofloksasin sebagai kontrol positif. Hasil penelitian menunjukkan adanya aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Bacillus subtilis* pada ekstrak daun kirinyuh konsentrasi 10 mg/disk dengan rerata diameter zona hambat $7,33 \pm 0,58$ mm dan $10,33 \pm 0,58$ mm dan pada ekstrak daun salam konsentrasi 10 mg/disk dengan rerata diameter zona hambat $15,67 \pm 0,58$ mm dan $15,67 \pm 0,29$ mm. Hasil analisis KLT menunjukkan ekstrak daun kirinyuh dan daun salam mengandung flavonoid, alkaloid, tanin, dan terpenoid. Uji bioautografi menunjukkan adanya zona hambat pada golongan senyawa terpenoid.

Kata Kunci: *Chromolaena odorata* L., *Syzygium polyanthum*, *Pseudomonas aeruginosa*, bioautografi, *Bacillus subtilis*

Abstract

Infection is the most common health problem encountered in everyday life. *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis* are bacteria that can cause local and systemic infections. The aim of this research was to test the antibacterial activity of kirinyuh (*Chromolaena odorata* L.) and bay leaves (*Syzygium polyanthum*) against the bacteria *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis* and identify groups of compounds that act as antibacterial agents. Ethanol (96%) was used in the maceration of the extract. Antibacterial activity test using the disc diffusion method. DMSO was used as a negative control, and the samples tested were extracts with concentrations of 2, 4, 6, 8, and 10 mg/disc. Using Ciprofloxacin as a positive control. The results showed that there was antibacterial activity against the bacteria *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis* in the kirinyuh leaf extract at a concentration of 10 mg/disc with a mean diameter of the inhibition zone of 7.33 ± 0.58 mm

and 10.33 ± 0.58 mm, respectively, and at the concentration of the bay leaf extract. 10 mg/disk with an average inhibition zone diameter of 15.67 ± 0.58 mm and 15.67 ± 0.29 mm, respectively. The results of TLC analysis showed that kirinyuh and bay leaf extracts contained flavonoids, alkaloids, tannins, and terpenoids. The bioautography test showed the existence of an inhibitory zone in the terpenoid compound group.

Keywords: *Chormolaena odorata* L., *Syzygium polyanthum*, *Pseudomonas aeruginosa*, bioautography, *Bacillus subtilis*

PENDAHULUAN

Infeksi merupakan masalah kesehatan paling umum ditemui dalam kehidupan sehari-hari. Parasit, bakteri, virus, dan jamur merupakan mikroorganisme yang dapat menyebabkan infeksi (Jawetz et al., 2013). Menurut WHO meskipun diare dapat dicegah dan diobati, tetapi merupakan penyebab utama kedua kematian di dunia, terutama pada kalangan anak kecil, prevalensi diare di Indonesia menurut karakteristik berdasarkan Riskesdas tahun 2018 bahwa anak usia < 1-14 tahun menduduki peringkat yang paling banyak menderita diare (Kemenkes, 2019).

Pseudomonas aeruginosa dan *Bacillus subtilis*, diketahui menyebabkan diare dan masalah pencernaan lainnya. Infeksi sekunder pada luka, luka bakar, serta diare pada bayi baru lahir dan infeksi saluran kemih, semuanya terkait dengan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* (Wuryanti & Murnah, 2009). *Bacillus subtilis* yang dikenal sebagai bakteri Gram positif dapat dengan cepat merusak makanan dan membuatnya tidak aman untuk dimakan (Mulyadi et al., 2017).

Salah satu tanaman yang berpotensi sebagai obat antidiare yaitu daun kirinyuh (*Chromolaena odorata* L.) dan daun salam (*Syzygium polyanthum*). Daun kirinyuh secara tradisional dapat digunakan sebagai obat kumur, malaria, penyembuhan luka, antidiare, antimikroba, antihipertensi, dan diuretik oleh masyarakat (Vital & Rivera, 2009). Secara historis, penyakit hipertensi, diabetes, mabuk karena alkohol, gatal-gatal, dan diare dapat diobati menggunakan daun salam (Winarno & Tim Karya Seni, 2004).

Penelitian Hidayatullah (2018) menunjukkan daun kirinyuh mengandung flavonoid, tanin, alkaloid, saponin, terpenoid, dan glikosida. Selain itu, senyawa fenolik yang ditemukan dalam daun kirinyuh dapat membantu melindungi sel kulit dari kerusakan. *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus spp*, *Acinetobacter spp*, dan *Citrobacter spp* merupakan mikroorganisme yang diuji aktivitas antibakterinya dalam penelitian tersebut. Ekstrak daun salam menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *Salmonella typhi* dan *Escherichia coli* (Evedi, 2017). Alkaloid, flavonoid, tanin, terpenoid, saponin, dan steroid merupakan senyawa yang ditemukan dalam ekstrak daun salam. Zona hambat ditemukan pada ekstrak etanol daun salam terhadap bakteri *Bacillus subtilis* dalam penelitian Setiawan (2014) dengan diameter 10,19 mm (konsentrasi 25%), 12,45 mm (konsentrasi 50%), 12,97 mm (konsentrasi 75%) dan 14,16 mm (konsentrasi 100%). Tujuan penelitian ini melakukan uji aktivitas antibakteri daun kirinyuh dan daun salam terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Bacillus subtilis*.

METODE PENELITIAN

Alat

Penelitian ini menggunakan alat autoklaf (Hirayama), bejana maserasi, *Laminar Air Flow (LAF) cabinet*, inkubator (Mammert), *rotary evaporator* (Stuart), oven (Mammert), *waterbath* (Mammert), *shaker incubator*, lampu UV, mikropipet (Socorex), tabung Mc Farland terstandar, dan neraca analitik (Ohaus).

Bahan

Daun kirinyuh diambil dari Kecamatan Cinangka dan daun salam diambil dari Kecamatan Kendal pada bulan Maret 2023, bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Bacillus subtilis*, etanol 96%, alkohol 70%, *blank disc* (Oxoid™), plat KLT, *Muler Hinton Agar* (MHA), *Brain Heart Infusion* (BHI), aquadest, DMSO, eppendorf, larutan NaCl 0,9%, pereaksi sitrobrat, pereaksi *Dragendroff*, pereaksi *Liebermann-Burchard*, FeCl₃, antibiotik Amoksisilin (Oxoid™), antibiotik Siprofloksasin (Oxoid™), antibiotik Ampisilin (Oxoid™), dan antibiotik Eritromisin (Oxoid™).

Prosedur penelitian

Ekstraksi

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Sebanyak 250 gram simplisia daun kirinyuh dan 300 gram daun salam direndam etanol 96% dengan perbandingan ekstrak:pelarut yakni 1:10, kemudian didiamkan selama 3 hari dengan dilakukan pengadukan setiap harinya. Untuk mengekstrak sebanyak mungkin bahan dari simplisia dilakukan remaserasi 3 hari. Dilakukan penyaringan filtrat, kemudian ekstrak dikentalkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50 °C dilanjutkan dengan *waterbath* selama 24 jam hingga didapatkan ekstrak kental dan dihitung hasil rendemen (Depkes RI, 2008).

Pembuatan seri konsentrasi

Konsentrasi ekstrak yang dibuat dalam penelitian ini yakni 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%. Ekstrak daun kirinyuh dan salam masing-masing diambil 5 gram kemudian dilarutkan dalam 5 mL DMSO 100%, selanjutnya dibuat seri pengenceran 80%, 60%, 40%, dan 20% dilarutkan dengan DMSO. Setiap konsentrasi ekstrak diteteskan ke kertas disk kosong sebanyak 10 µL. Konsentrasi ekstrak dalam disk sebesar 2, 4, 6, 8, dan 10 mg/disk.

Sterilisasi alat dan bahan

Alat-alat gelas dicuci, kemudian dikeringkan dan dibungkus rapat dengan kertas yang bersih lalu disterilkan dengan oven dalam suhu 170 °C selama ± 2 jam. *Laminar Air Flow cabinet* disemprot menggunakan alkohol 70% dan disterilkan selama 15 menit menggunakan UV. Disterilkan jarum ose bulat dan pinset menggunakan api bunsen. Disterilkan *blue tips*, media *Brain Heart Infusion* (BHI), *white tips*, media *Muler Hinton Agar* (MHA), serta eppendorf menggunakan autoklaf dengan suhu 121 °C dalam 2 jam (Handayani et al., 2016).

Pembuatan media

Panaskan 100 mL aquades dengan 3,8 gram serbuk MHA yang digunakan sebagai media untuk mendeteksi sensitivitas bakteri dan 100 mL aquadest dengan 3,7 gram BHI yang digunakan sebagai media untuk menumbuhkan organisme, keduanya dilarutkan dalam labu

erlenmeyer di atas *hot plate*. Labu erlenmeyer yang dibungkus aluminium foil ditutup dengan karet gelang sebelum diautoklaf. Setelah media disterilkan didiamkan pada suhu ruang selama beberapa waktu, lalu media tersebut dituangkan dalam cawan petri sampai merata, kemudian dibiarkan mengeras, semua dilakukan dalam LAF agar media yang dibuat tetap steril.

Kultur dan pembuatan suspensi bakteri

Teknik *streak plate* 4 kuadran digunakan untuk menumbuhkan *Pseudomonas aeruginosa* dan *Bacillus subtilis* dengan memindahkan 1 ose bakteri menggunakan ose bulat steril, kemudian menggoreskan bakteri tersebut di atas media MHA dan diinkubasi 24 jam dalam suhu 37 °C. Diinokulasikan 3-5 koloni bakteri ke dalam BHI cair 4-5 mL dengan ose bulat steril, kemudian campuran tersebut diinkubasi dalam suhu 37 °C selama 2-3 jam. Larutan bakteri diambil sebanyak 1 mL ditambahkan dengan NaCl 0,9% hingga kekeruhannya mencapai standar Mc Farland (Mawea et al., 2019).

Uji sensitivitas bakteri

Uji sensitivitas bakteri menggunakan metode *disc diffusion* (uji Kirby Bauer). Antibiotik yang digunakan yakni antibiotik berspektrum luas yakni eritromisin, siprofloksasin, ampicilin, dan amoksisilin. Permukaan media MHA diinokulasikan dengan suspensi bakteri uji sebanyak 200 µL, lalu cakram antibiotik diletakkan di atasnya. Setelah inkubasi dengan waktu 24 jam menggunakan suhu 37 °C, selanjutnya diamati zona hambatan yang terbentuk (Pramita, 2013).

Uji aktivitas antibakteri

Teknik *disc diffusion* (uji Kirby Bauer) digunakan untuk menguji aktivitas antibakteri dalam penelitian ini. Digunakan *spreader glass* steril untuk meratakan 200 µL suspensi bakteri pada media MHA, lalu didiamkan selama 10 menit. Ekstrak daun kirinyuh dan daun salam diuji aktivitas antibakterinya dengan konsentrasi yang bervariasi (20%, 40%, 60%, 80, dan 100%), kemudian diaplikasikan pada *blank disk* steril masing-masing 10 µL, dibiarkan mengering dan ditempelkan pada media agar yang telah diinokulasi. Sebagai kontrol positif menggunakan antibiotik dengan zona hambat sensitivitas terbesar dan sebagai kontrol negatif menggunakan DMSO. Pertumbuhan bakteri ditentukan dengan mengamati zona hambat setelah 24 jam inkubasi dalam suhu 37 °C (Pramita, 2013).

Uji KLT (Kromatografi Lapis Tipis)

Plat KLT diaktifkan dengan memanaskannya dalam suhu 100 °C dengan waktu 10 menit untuk menghilangkan kandungan airnya. Digunakan mikropipet 1 µL untuk menotolkan ekstrak dengan konsentrasi aktif. Ekstrak dipisahkan secara KLT dengan menggunakan kloroform : etil asetat (15:2 v/v) sebagai fase gerak untuk ekstrak daun kirinyuh, dan N-heksan : etil asetat : acetone (4:2:4 v/v/v) sebagai fase gerak untuk ekstrak daun salam. Kromatogram yang dihasilkan diamati bercaknya di bawah UV 254 nm dan UV 366 nm. Identifikasi flavonoid dilakukan dengan pereaksi sitroborat, *Dragendorff* untuk melihat senyawa alkaloid, FeCl₃ untuk melihat senyawa tanin, dan peraksi *Lieberman-Burchard* untuk melihat senyawa terpenoid.

Uji bioautografi

Plat yang sudah dielusi ditempatkan di atas media MHA yang diinokulasi dengan bakteri uji. Didiamkan 30 menit dalam suhu ruang, lalu plat dikeluarkan dari media dan diangkat. Setelah 24 jam inkubasi suhu 37 °C, diperiksa ada atau tidaknya zona hambat (Lukman, 2016).

Analisis data

Uji aktivitas antibakteri dilihat ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Bacillus subtilis* oleh ekstrak daun kirinyuh dan daun salam dengan mengukur diameter hambatan. Pengaruh berbagai konsentrasi terhadap besarnya zona hambat ditentukan dengan menganalisis data yang dikumpulkan dari uji aktivitas antibakteri menggunakan uji statistik SPSS versi 26 taraf kepercayaan 95%. Data dianalisis dengan uji normalitas, dilanjutkan dengan uji homogenitas dan *Kruskal-Wallis*, apabila data yang dihasilkan signifikan dapat dilanjutkan dengan uji *post hoc multiple comparison*. Pada uji KLT, plat KLT dianalisis kualitatif menurut warna yang ditimbulkan setelah itu dihitung juga nilai Rf nya. Untuk uji bioautografi, KLT dielusi terlebih dahulu, kemudian ditempelkan pada media dan diamati apakah ada zona hambat yang terbentuk, jika terdapat zona hambat dihitung nilai Rf nya. Nilai Rf dapat dihitung menggunakan rumus 1.

$$Rf = \frac{\text{Jarak bercak dari tempat penotolan}}{\text{Jarak elusi}} \quad (1)$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil ekstraksi

Proses ekstraksi bertujuan untuk memisahkan bahan dari campuran dengan menggunakan pelarut. Maserasi dalam penelitian ini menggunakan pelarut etanol 96%. Hasil ekstraksi daun kirinyuh didapat 23,70 gram ekstrak kental (rendemen 9,48%) dan daun salam didapat 32,15 gram ekstrak kental (rendemen 10,72%).

Hasil uji sensitivitas antibiotik

Uji sensitivitas dilakukan untuk menentukan antibiotik yang efektif terhadap bakteri. Semakin sensitif suatu antibiotik terhadap bakteri yang diuji, maka semakin besar lebar zona hambatan yang terbentuk (Mycek & dkk, 2001). Zona hambat yang paling besar digunakan sebagai kontrol positif pada pengujian antibakteri. Uji sensitivitas bakteri pada penelitian ini, pada *Pseudomonas aeruginosa* dan *Bacillus subtilis* keduanya menggunakan disk antibiotik Siprofloksasin 5µg (Oxoid™), Amoksisilin 25µg (Oxoid™), Ampisilin 10µg (Oxoid™), dan Eritromisin 15µg (Oxoid™).

Pada Tabel 1 menunjukkan hasil uji sensitivitas bahwa siprofloksasin menghasilkan zona hambat terbesar yakni $33,67 \pm 0,76$ mm dan $34,33 \pm 0,56$ mm pada bakteri *P. aeruginosa* dan bakteri *B. subtilis* dan akan digunakan sebagai kontrol positif. Potensi antibakteri dapat dinilai efektif jika diameter hambatan yang dihasilkan $\pm 14-16$ mm. Siprofloksasin merupakan antibiotik berspektrum luas yang termasuk golongan florokuinolon, dan biasanya dipakai untuk terapi lini pertama untuk pasien diare. Antibiotik seperti Siprofloksasin bekerja dengan

menghambat enzim DNA gyrase dalam bakteri Gram positif dan Gram negatif (Tjay & Rahardja, 2015).

Tabel 1. Hasil uji sensitivitas terhadap *Pseudomonas aeruginosa* dan *Bacillus subtilis*

| Antibiotik | Rata- rata diameter zona hambat (mm) ± SD | |
|---------------------|---|--------------------------|
| | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | <i>Bacillus subtilis</i> |
| Siprofloksasin 5 µg | 33,67 ± 0,76 | 34,33 ± 0,56 |
| Amoksisilin 25µg | 6 ± 0 | 5,83 ± 0,29 |
| Ampisilin 10µg | 6 ± 0 | 9,5 ± 0,5 |
| Eritromisin 15µg | 9,33 ± 0,56 | 16 ± 1 |

Keterangan : Diameter disk 6 mm

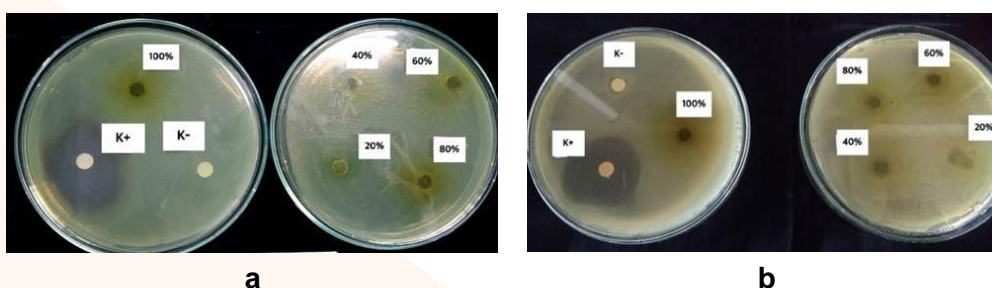
Hasil Uji Antibakteri

Uji antibakteri dengan metode *disc diffusion* (uji Kirby Bauer). Konsentrasi yang digunakan 2, 4, 6, 8, dan 10 mg/disk, DMSO sebagai kontrol negatif sedangkan control positif menggunakan siprofloksasin.

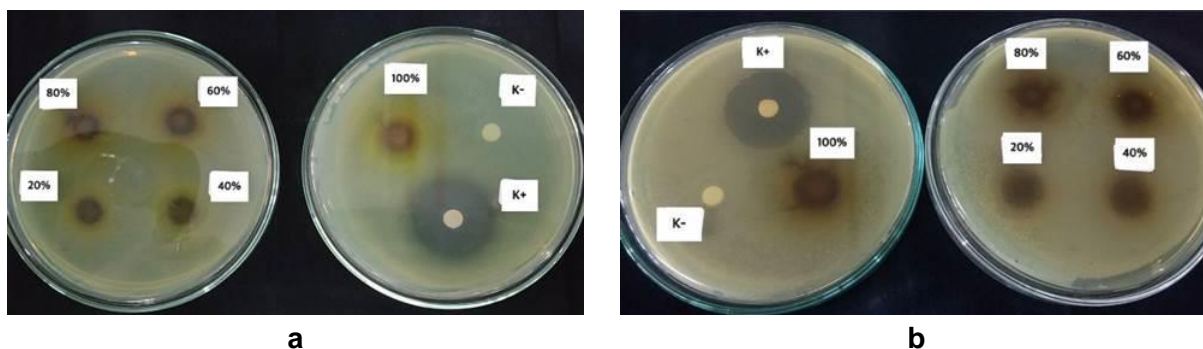
Tabel 2. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak daun kirinyuh dan daun salam terhadap bakteri *P. aeruginosa* dan *B. subtilis*

| Bakteri | Rata-rata diameter zona hambat (mm) ± SD | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------|---|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|-------|--------------|--------------|--|--------------|--------------|--------------|-------|
| | Konsentrasi ekstrak daun kirinyuh (mg/disk) | | | | | K+ | | K- | | Konsentrasi ekstrak daun salam (mg/disk) | | | | |
| | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 | Cipro | DMSO | 2 | 40 | 6 | 8 | 10 | Cipro | DMSO |
| <i>P. aeruginosa</i> | 6,33 ± 0,29 | 6,67 ± 0,29 | 6,83 ± 0,29 | 7,17 ± 0,29 | 7,33 ± 0,58 | 34,33 ± 1,15 | 6 ± 0 | 12,67 ± 1,15 | 13,33 ± 0,58 | 14 ± 1 | 14,5 ± 0,5 | 15,67 ± 0,58 | 32 ± 1 | 6 ± 0 |
| <i>B. subtilis</i> | 6,5 ± 0,5 | 7,67 ± 0,58 | 8,67 ± 0,58 | 9,17 ± 0,29 | 10,33 ± 0,58 | 32,67 ± 0,58 | 6 ± 0 | 12,17 ± 0,29 | 13,17 ± 0,29 | 14,17 ± 0,29 | 15,17 ± 0,29 | 15,67 ± 0,29 | 32,83 ± 0,76 | 6 ± 0 |

Keterangan : Diameter disk 6 mm



Gambar 1. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak daun kirinyuh terhadap (a) *Pseudomonas aeruginosa*, dan (b) *Bacillus subtilis*



Gambar 2. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak daun salam terhadap (a) *Pseudomonas aeruginosa*, dan (b) *Bacillus subtilis*

Hasil uji pada tabel 2 dan gambar 1, menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun kirinyuh dengan konsentrasi 10 mg/disk menghasilkan diameter zona hambat $7,33 \pm 0,58$ mm dan $10,33 \pm 0,58$ mm pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Bacillus subtilis*. Kemudian untuk ekstrak etanol daun salam (tabel 2 dan gambar 3) dengan konsentrasi dan bakteri yang sama menghasilkan diameter zona hambat $15,67 \pm 0,58$ mm dan $15,67 \pm 0,29$ mm. Konsentrasi ekstrak yang digunakan dapat berpengaruh pada ukuran zona hambat. Hal ini sesuai dengan temuan analisis zona hambatan ekstrak etanol daun salam terhadap bakteri *Bacillus subtilis* dalam penelitian Setiawan & Martioso (2014) dengan diameter 10,19 mm (konsentrasi 25%), 12,45 mm (konsentrasi 50%), 12,97 mm (konsentrasi 75%) dan 14,16 mm (konsentrasi 100%), sehingga dapat disimpulkan apabila digunakan konsentrasi ekstrak yang semakin tinggi, maka akan menghasilkan zona hambatan yang semakin besar.

Ekstrak etanol daun kirinyuh menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap bakteri *P. aeruginosa* dan *B. subtilis* dengan zona hambat yang tergolong lemah, sedangkan ekstrak etanol daun salam terdapat aktivitas antibakteri dengan zona hambat yang tergolong kuat. Meskipun kedua ekstrak menghambat pertumbuhan bakteri, zona hambat terhadap *Bacillus subtilis* lebih besar daripada *Pseudomonas aeruginosa*, karena susunan kimia dinding sel kedua jenis bakteri yang berbeda. Bakteri Gram positif memiliki satu lapisan peptidoglikan, sehingga lebih rentan terhadap bahan kimia antibakteri daripada bakteri Gram negatif, yang mempunyai tiga lapisan dinding sel yaitu lipopolisakarida, protein, dan peptidoglikan (Pelczar & Chan, 2015).

Uji statistik analisis ekstrak daun kirinyuh dan daun salam dianalisis menggunakan program SPSS versi 26. Beberapa hasil uji yang didapat dibandingkan dengan nilai P yakni 0,05. Hasil uji normalitas ekstrak daun kirinyuh terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Bacillus subtilis*, $0,000 < P$, tidak terdistribusi normal. Pengujian homogenitas untuk bakteri *P. aeruginosa* dan *B. subtilis* memiliki nilai P signifikansi berurutan 0,002 dan $0,000 < P$, kedua data bersifat tidak homogen, tidak dapat dilanjutkan dengan ANOVA, namun dengan uji *Kruskal-Wallis*. Hasil asymp sig. secara berturut-turut $0,007$ dan $0,022 < P$, artinya adanya perbedaan bermakna pada setiap kelompok yang diberi perlakuan. Hasil data *Post hoc multiple comparison* untuk membandingkan hasil dari setiap kelompok dan melihat data yang memiliki nilai signifikansi, diperoleh beberapa kelompok uji memiliki nilai signifikansi $< P$ (0,05). Hal ini menunjukkan bahwa zona hambat dipengaruhi oleh konsentrasi ekstrak.

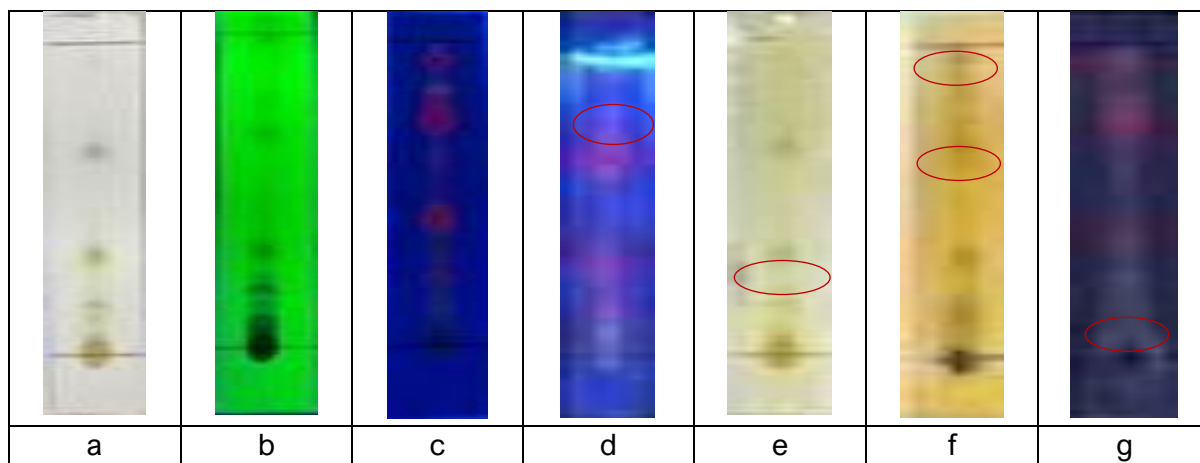
Ekstrak daun salam terhadap bakteri *P. aeruginosa* dan *B. subtilis*, hasil uji normalitas dari keduanya $0,000 < P$, dapat dikatakan tidak terdistribusi normal. Pengujian homogenitas untuk bakteri *P. aeruginosa* dan *B. subtilis* memiliki nilai P signifikansi berurutan $0,179 > P$ yang artinya data bersifat homogen dan $0,000 < P$ artinya data bersifat tidak homogen, dilanjutkan dengan uji *Kruskal-Wallis* dan didapatkan hasil asymp sig. secara berurutan $0,007$ dan $0,021 < P$, artinya ada perbedaan bermakna setiap perlakuan kelompok. Hasil data *Post hoc multiple comparison* diperoleh hasil ada beberapa kelompok uji yang memiliki nilai signifikansi $< P$ ($0,05$), terdapat pengaruh konsentrasi ekstrak dengan zona hambat yang dihasilkan.

Hasil uji KLT (Kromatografi Lapis Tipis)

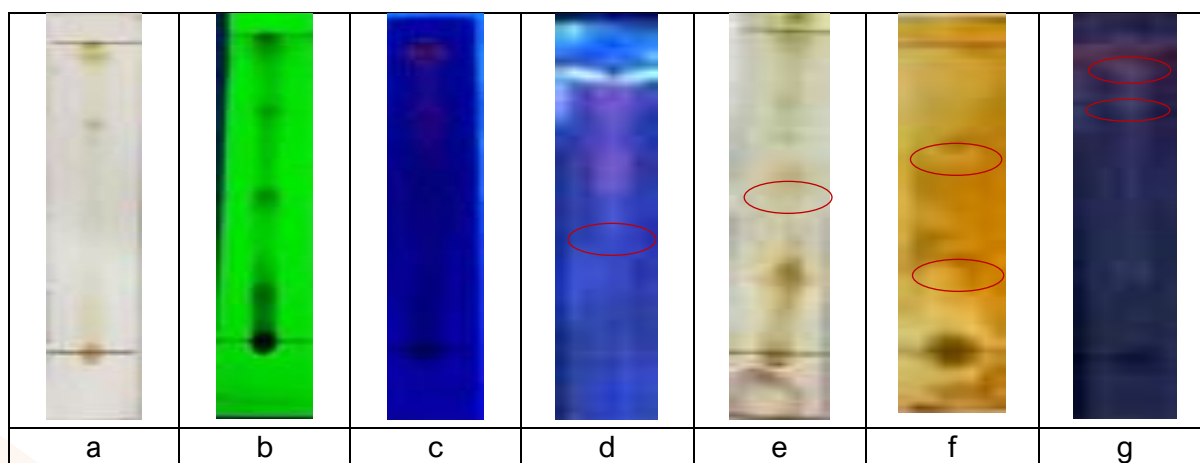
Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan metode kromatografi yang dapat memisahkan zat organik menjadi komponen yang berbeda, selain itu memiliki kelebihan prosedur operasi yang sederhana, cepat, dan ekonomis serta waktu analisis yang relatif singkat. Dalam analisis ini, plat silika gel GF₂₅₄ berfungsi sebagai fase diam, sedangkan kloroform : etil asetat (15:2 v/v) digunakan sebagai fase gerak untuk daun kirinyuh dan n-heksan : etil asetat : aseton (4:2:4 v/v/v) digunakan sebagai fase gerak untuk daun salam. Eluen dibuat jenuh untuk menyamakan tekanan uap yang ada di dalam *chamber*. Ekstrak ditotolkan 1 kali pada plat sebanyak 1 μ L menggunakan mikropipet yang selanjutnya dilihat dan diamati dengan UV 254 nm dan UV 366 nm (tabel 3, gambar 3, dan gambar 4).

Tabel 3. Hasil uji fitokimia pada plat KLT ekstrak etanol daun kirinyuh dan daun salam

| Plat | Reagen semprot | Rf | Visualisasi | Warna / flourosensi | Keterangan |
|---|----------------------------|---------------------|--------------|---------------------|---------------|
| Ekstrak daun kirinyuh (<i>Chromolaena odorata</i> L.) | Sitroborat | 0,48 | UV 366 | Kuning kehijauan | (+) Flavonoid |
| | <i>Dragendorff</i> | 0,32 | Sinar tampak | Coklat tua | (+) Alkaloid |
| | FeCl ₃ | $\frac{0,66}{0,96}$ | Sinar tampak | Coklat kehitaman | (+) Tanin |
| | <i>Liebermann-Burchard</i> | 0,14 | UV 366 | Keunguan | (+) Terpenoid |
| Ekstrak daun salam (<i>Syzygium polyanthum</i>) | Sitroborat | 0,50 | UV 366 | Kuning kehijauan | (+) Flavonoid |
| | <i>Dragendorff</i> | 0,60 | Sinar tampak | Coklat tua | (+) Alkaloid |
| | FeCl ₃ | $\frac{0,38}{0,68}$ | Sinar tampak | Coklat kehitaman | (+) Tanin |
| | <i>Liebermann-Burchard</i> | 0,82 | UV 366 | Keunguan | (+) Terpenoid |
| | | $\frac{0,98}{0,98}$ | | | |



Gambar 3. Hasil uji KLT ekstrak daun kirinyuh dengan (a) visibel, (b) UV 254 nm, (c) UV 366 nm, (d) sitoborat-UV 366 nm, (e) *dragendorff-sinar tampak*, (f) FeCl_3 -visibel, (g) *Liebermann-Burchard-UV 366 nm*.



Gambar 4. Hasil uji KLT ekstrak daun salam secara a) visibel, (b) UV 254 nm, (c) UV 366 nm, (d) sitoborat-UV 366 nm, (e) *dragendorff-sinar tampak*, (f) FeCl_3 -visibel, (g) *Liebermann-Burchard-UV 366 nm*.

Reagen sitroborat dapat mendeteksi senyawa flavonoid dengan sinar UV 366 dan akan menghasilkan bercak kuning kehijauan (Lestari & Santoso, 2021). Ekstrak daun kirinyuh dan daun salam positif mengandung flavonoid karena menghasilkan bercak kuning kehijauan dengan sinar UV 366 dengan nilai Rf yang didapatkan secara berurutan sebesar 0,48 dan 0,50. Deteksi flavonoid, sitroborat merupakan reagen yang sangat sensitif dan spesifik (Hanani, 2015). Pereaksi semprot *Dragendorff* akan menunjukkan bercak coklat tua pada kondisi pencahayaan biasa jika terdapat komponen alkaloid (Wagner & Bladt, 1996). Ekstrak daun kirinyuh dan daun salam, bila terkena sinar tampak, menunjukkan karakteristik bercak coklat tua (adanya alkaloid) dengan nilai Rf berurutan 0,32 dan 0,60.

Bila terkena sinar tampak, titik-titik coklat kehitaman yang dihasilkan oleh reagen FeCl_3 menunjukkan adanya molekul tanin (Wagner & Bladt, 1996). Tanin dapat diidentifikasi secara pasti dalam ekstrak kirinyuh dan daun salam dengan sinar tampak menjadi bercak coklat-hitam

dengan nilai Rf 0,66 dan 0,96 terdapat di ekstrak daun kirinyuh, sedangkan nilai Rf 0,38 dan 0,68 terdapat di ekstrak daun salam. Pereaksi semprot *Liebermann-Burchard* bereaksi terhadap molekul terpenoid dan dapat berpendar dengan warna keunguan saat terkena sinar UV 366 (Hanani, 2015). Ekstrak daun kirinyuh dan daun salam pada UV 366 nm menunjukkan ciri bercak keunguan, dengan nilai Rf berurutan 0,14 dan 0,86 yang menunjukkan terpenoid.

Analisis KLT ekstrak daun kirinyuh dan daun salam positif mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, tanin, dan terpenoid. Hasil penelitian ekstrak daun kirinyuh selaras dengan penelitian oleh Hidayatullah (2018) menunjukkan ekstrak daun kirinyuh mengandung senyawa flavonoid, glikosida, saponin, alkaloid, tannin, dan terpenoid. Penelitian yang telah dilakukan oleh Evendi (2017) menunjukkan bahwa ekstrak daun salam memiliki senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, tannin, terpenoid dan steroid.

Hasil uji bioautografi

Analisis bioautografi dirancang untuk menentukan senyawa dalam ekstrak yang memiliki sifat antibakteri. Secara khusus plat KLT ditempelkan di media yang telah diinokulasikan bakteri uji melalui teknik kontak dalam uji bioautografi (Papatungan et al., 2019). Plat KLT ditotolkan dengan ekstrak dan dielusi dengan eluen, kemudian ditempelkan pada permukaan cawan petri yang berisi media agar selama 30 menit. Plat KLT dilepas, lalu diinkubasi 24 jam dalam suhu 37 °C. Terbentuknya zona bening di bagian-bagian spot menunjukkan keberhasilan uji. Kekurangan metode ini sulitnya penyerapan pada media agar untuk memperoleh hasil kontak yang optimum, sehingga memungkinkan melekatnya suspensi bakteri pada lempeng kromatogram ketika diangkat.

Tabel 4. Hasil uji KLT-Bioautografi ekstrak etanol daun salam terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Bacillus subtilis*

| Bakteri | Rf | Keterangan |
|----------------------|------|--|
| <i>P. aeruginosa</i> | 0,98 | diduga senyawa terpenoid mampu sebagai antibakteri |
| <i>B. subtilis</i> | 0,82 | diduga senyawa terpenoid mampu sebagai antibakteri |

Uji KLT yang sebelumnya telah dilakukan diduga kedua ekstrak memiliki beberapa senyawa yang berpotensi sebagai antibakteri. Ekstrak etanol daun kirinyuh tidak dilakukan uji bioautografi karena diameter zona hambatan yang terbentuk ketika dilakukan uji aktivitas antibakteri tergolong lemah di semua konsentrasi yakni < 10 mm, sehingga jika dilakukan uji lanjutan bioautografi kemungkinan besar tidak ada zona hambat yang terbentuk. Berdasarkan tabel 4, ekstrak etanol daun salam terhadap bakteri *P. aeruginosa* dan *B. subtilis* menunjukkan hasil Rf zona hambat berturut-turut 0,98 dan 0,82, hasil Rf keduanya berada pada sekitar nilai Rf golongan senyawa terpenoid, sehingga dapat dikatakan bahwa golongan senyawa terpenoid berpotensi sebagai antibakteri. Terpenoid adalah golongan senyawa yang memiliki bau yang ditemukan pada tumbuhan dan dapat dipisahkan dari komponen nabati untuk membentuk minyak atsiri melalui penyulingan (Minarno, 2015). Meskipun mekanisme tidak

sepenuhnya diketahui, terpenoid mempunyai aktivitas sebagai antimikroba, dan diduga bekerja dalam pengrusakan membran yang disebabkan oleh senyawa lipofilik (Cowan, 1999). Penelitian ini menunjukkan golongan terpenoid bersifat antibakteri yang ditandai dengan adanya zona hambat saat uji bioautografi.

KESIMPULAN

Ekstrak etanol daun kirinyuh dan daun salam memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Bacillus subtilis*. Terdapat kandungan senyawa flavonoid, alkaloid, tanin, dan terpenoid, berdasarkan uji KLT. Uji bioautografi ekstrak etanol daun salam terhadap bakteri *P. aeruginosa* dan *B. subtilis* menunjukkan hasil Rf zona hambat secara berurutan 0,98 dan 0,82, yang diduga sebagai golongan senyawa terpenoid.

DAFTAR PUSTAKA

- Cowan, M. M. (1999). Plants products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*.
- Depkes RI. (2008). *Farmakope herbal*. Jakarta: Kementrian Kesehatan RI.
- Evendi, A. (2017). Uji fitokimia dan antibakteri ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum*) terhadap bakteri *Salmonella typhi* dan *Escherichia coli* secara in vitro. *Mahakam Medical Laboratory Technology Journal*, 11(1), 53.
- Hanani, E. (2015). *Analisis fitokimia*. Jakarta: Buku Kedokteran EGC.
- Handayani, F., Warnida, H., & Nur, S. H. (2016). Formulasi dan uji aktivitas antibakteri *Streptococcus mutans* dari sediaan mouthwash ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum* (Wight) Walp.). *Media Sains*, 9(1), 2355-9136.
- Hidayatullah, E. (2018). Potensi ekstrak etanol tumbuhan kirinyuh (*Chromolaena odorata*) sebagai senyawa anti-bakteri. *Proceeding of The 7th University Research Colloquium: Bidang MIPA dan Kesehatan*. Stikes PKU Muhammadiyah Surakarta.
- Jawetz, Melnick, & Adelberg. (2013). *Medical microbiology. 26th Edition*. USA: Mc Graw Hill Company.
- Kemendes, RI. (2019). *Rencana strategis kementerian kesehatan tahun 2015-2019*. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI.
- Lestari, S. I., & Santoso, B. (2021). Analisis kromatografi lapis tipis (KLT) dan aktivitas penangkapan radikal bebas (PRB) ekstrak etanol lempuyang empurit (*Zingiber americanus*) hasil maserasi sekali dan maserasi berulang. *Biomedika*, 13(1), 76-82. DOI: 10.23917/biomedika.v13i1.11439.
- Lukman, A. (2016). Uji aktivitas antibakteri ekstrak daun kemangi (*Ocimum sanctum* L.) terhadap bakteri patogen dengan metode KLT bioautografi. *Skripsi*. Universitas Islam Negeri Alauddin Makassar.
- Mawea, F., Maarisit, W., Datu, O., & Potalangi, N. (2019). Efektivitas ekstrak daun cempedak *Artocarpus integer* sebagai antibakteri. *Jurnal Biofarmasetika Tropis*, 2(1), 115-122. DOI: <https://doi.org/10.55724/jbiofarmtrop.v2i1.52>.
- Minarno, E. B. (2015). Skrining fitokimia dan kandungan total flavanoid pada buah *Carica pubescens* lenne & K. koch di kawasan Bromo, Cangar, dan dataran tinggi Dieng. *El-Hayyah*, 5(2), 73-82. DOI: 10.18860/elha.v5i2.3022.

- Mulyadi, M., Wuryanti, W., & Sarjono, P. B. (2017). Konsentrasi hambat minimum (KHM) kadar sampel Alang-Alang (*Imperata cylindrica*) dalam etanol melalui metode difusi cakram. *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*, 20(3), 130-135. <https://doi.org/10.14710/jksa.20.3.130-135>.
- Paputungan, A. N., Widya, A. L., & Imam, J. (2019). Aktivitas antibakteri dan analisis KLT-Bioautografi dari fraksi daun manggis (*Garcinia mangostana* L.). *PHARMACON*, 8(3), 525-534. DOI: 10.35799/pha.8.2019.29326.
- Pelczar, J. M., & Chan, E. C. (2015). *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Jakarta: Penerbit Universitas Indonesia.
- Pramita, F.Y. (2013). Formulasi sediaan gel antiseptik ekstrak metanol daun kesum *Polygonum minus* Huds). *Skripsi*. Pontianak: Universitas Tanjungpura Pontianak.
- Setiawan, V., & Martioso, P. S. (2014). Antimicrobial effect of etanol extract of salam leaves (*Syzygium polyanthum*) against *Echerichia coli* and *Bacillus subtilis* in vitro. *Skripsi*. Bandung: Universitas Kristen Maranatha.
- Tjay, T. H., & Rahardja, K. (2015). *Obat-obat penting edisi 7*. Jakarta: Elex Media komputer.
- Vital, P. G., & Rivera, W. L. (2009). Antimicrobial activity and cytotoxicity of *Chromolaena odorata* (L. f.) King and Robinson and *Uncaria perrottetii* (A. Rich) Merr. Extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(7), 511-518. <https://doi.org/10.5897/JMPR.9000160>.
- Wagner, H., & Bladt, S. (1996). *Plant drug analysys a thin layer chromatography, Second Ed*. New York: Spinger.
- Winarno, W. P., & Tim Karya Seni. (2004). *Memfaatkan bumbu dapur untuk mengatasi aneka penyakit*. Depok: Agromedia Pustaka.
- Wuryanti, & Murnah. (2009). Uji ekstrak bawang bombay terhadap anti bakteri gram negatif *Pseudomonas aeruginosa* dengan metode difusi cakram. *Jurnal Sains & Matematika*, 17(3).