

Aplikasi Metode Bioautografi Dalam Penelusuran Daya Antibakteri Ekstrak Pegagan (*Centella asiatica* (L.))

Rehmadanta Sitepu, Ririn Nurdiani, Rollando Rollando

Program Studi Farmasi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Ma Chung, Malang, Indonesia,

Detail Artikel

Diterima : 29 Februari 2020

Direvisi : 1 April 2020

Diterbitkan : 25 April 2020

Kata Kunci

Antibacteria

Pegagan

Escherichia coli

Staphylococcus aureus

Penulis Korespondensi

Nama: Rehmadanta Sitepu

Afiliasi : Universitas Ma Chung

Email :

rehmadanta.sitepu@machung.ac.id

senyawa aktif menggunakan eluen metanol: kloroform: asam asetat glasial menghasilkan 1 titik spot pada Rf 0,5-0,7 digunakan dalam penelusuran pengujian daya antibakteri dengan metode autografi dan menunjukkan adanya pembentukan zona bening. Pada uji kuantitatif, ekstrak etanol pegagan memiliki nilai KHM 3.200 µg/mL baik pada *Escherichia coli* maupun *Staphylococcus aureus*. Nilai Kadar Bunuh Minimum (KBM) lebih dari 6.400 µg/mL aktivitas daya hambat dengan diameter 0,06±0,05 mm pada *E.coli* dan 0,04±0,019 mm untuk *S. aureus*

ABSTRAK

Centella asiatica (L.) Urban (Pegagan) adalah spesies tumbuhan herbal tradisional dengan karakteristik tumbuh merambat dan berbunga di sepanjang tahun. Komponen bioaktif yang dimiliki pegagan dalam beberapa aspek, dapat digunakan dalam pengobatan penyakit. Golongan-golongan senyawa bioaktif pegagan yang memiliki daya antibakteri adalah saponin, flavonoid, dan tanin. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun pegagan dengan metode Disc Diffusion Test pada *Escherichia coli* maupun *Staphylococcus aureus*. Ekstrak tanaman Pegagan diperoleh dengan maserasi dengan etanol 70%, pemisahan golongan senyawa aktif salah satunya flavonoid menggunakan skrining fitokimia, yang secara kualitatif menunjukkan ekstrak tanaman mengandung flavonoid. Hasil Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

ABSTRACT

Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) is a traditional herbal plant that spread as it grows and in bloom throughout the year. Pegagan is believed to be able to cure various type of diseases because it contains bioactive component that's good for human body. Pegagan's bioactive component that has anti-bacterial properties are saponin, flavonoid, and tanin. This study was conducted with the purpose to determine the existence of antibacterial activity in ethanol extract of pegagan leaves by applying it in Disc Diffusion Test method against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* bacteria. Ethanol extract was obtained by using maserasi method with 70% ethanol, separation of the active compound group which one of them is flavonoid using phytochemical screening, and the result was that the pegagan positively contains flavonoid, it was proven by the existence of a red marker on the tube. The result of active compound using methanol eluent: chloroform: glacial acetic acid produces 1 spot point on (Rf 0,5-0,7) on TLC. This spot was used in antibacterial screening by bioautography method and the activity was detected qualitatively. Antibacterial activity was proved by Disc Diffusion Test which the results were ethanol extract on pegagan has inhibitory activity to *E.coli* and *S. aureus*. This study can be concluded that ethanol extract of *Centella asiatica* has a MIC value of 3,200 µg / mL both in *E. Coli*

and *S. aureus*. The diameter of obstacles zone were $0,06\pm 0,05$ mm to *E.coli* and $0,04\pm 0,019$ mm to *S. aureus*.

PENDAHULUAN

Penyakit infeksi merupakan penyakit yang paling banyak prevalensinya di Indonesia, bahkan di dunia. Bakteri menjadi salah satu penyebab terjadinya infeksi paling banyak selain virus. Umumnya infeksi bakteri akan menyerang saluran pencernaan dan kulit. Umumnya, mikroorganisme yang menimbulkan infeksi pada jaringan ini adalah *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Escherichia coli* termasuk golongan gram negatif yang umum menyebabkan penyakit di saluran pencernaan, biasanya diare, namun jika dalam tingkat infeksi yang parah dapat menyebabkan pendarahan usus. *Staphylococcus aureus* termasuk dalam kelompok gram positif penyebab infeksi seperti bisul, pneumoniae, meningitis dan lain lain.

Pencarian alternatif kandidat antiinfeksi dilakukan secara intensif dilakukan dalam upaya penganggulangan penyakit infeksi secara masif. Beberapa kandidat antibakteri telah mulai dikembangkan dari bahan alam Indonesia. Ekstrak kulit batang Manggis (*Garcinia mangostana* L) telah diketahui memiliki daya antibakteri terhadap bakteri *S. Aureus* (Aziz, 2015). Ekstak daun Gaharu (*Aquilaria microcarpa* Bail) telah diketahui memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *S. aureus* dan *Proteus mirabilis* (Sari, Muhani, & Fajriaty, 2017). Bahkan tanaman herba Pegagan, sebagaimana penelusuran pustaka yang dilakukan oleh Besung, memiliki keistimewaan mengandung golongan-golongan metabolit sekunder yang dapat diterapkan sebagai antibakteri (Besung, 2009).

Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) merupakan salah satu tanaman obat yang dapat dimanfaatkan oleh penduduk Indonesia dalam pengobatan penyakit. Tanaman ini merupakan tanaman liar yang tumbuh di Indonesia, yang sering dimanfaatkan untuk pengobatan herbal di Indonesia, nama tanaman pegagan berbeda beda bergantung pada daerahnya, Pegagan biasanya ditemukan luas seperti di lapangan terbuka dan lembab contohnya tegalan, persawahan, bahkan pada tepi tembok rumah. *Centella asiatica* (L) Urban dapat didefinisikan sebagai tumbuhan kosmopolit yang daerah penyebarannya menyebar luas, terutama daerah tropis dan subtropis, termasuk Indonesia.. menunjukkan bahwa pemberian ekstrak pegagan memberikan penghambatan terhadap *Escherichia Coli* yang tidak terlepas dari zat antibakteri yang dimiliki oleh pegagan yaitu Saponin, Tanin, dan flavonoid (Agfadila, W, & Puspawati, 2017).

Penelitian bertujuan ini menemukan antibakteri dari ekstrak pegagan sebagai melalui penelusuran dengan metode bioautografi yang selanjutnya ditentukan Kadar Hambat Minimum (KHM) serta Kadar Bunuh Minimum (KBM) menggunakan pendekatan metode *Disc Diffusion Test*, sehingga dapat menunjang pengobatan infeksi yang disebabkan oleh *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Bioautografi merupakan suatu pengembangan metode menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) untuk mendapatkan kandidat antibakteri yang lebih spesifik dengan mengaplikasikan plat KLT ke media pertumbuhan bakteri (Choma & Grzelak, 2011). Metode ini belum banyak dikembangkan dalam penelusuran kandidat antibakteri pada tanaman herbal.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Peralatan pada penelitian ini adalah alat dan wadah untuk maserasi, *water bath*, evaporator (IKA Lab), cawan porselen, pipet tetes, autoklaf (All American), ose, lampu bunsen, cawan petri, pinset, tabung reaksi (Pyrex-Germany dan Iwaki), tabung eppendorf, inkubator (Ecocell, MMM), spektrofotometri UV-Vis, pipet, mikropipet 10-1000 μ L (Socorex), rak tabung reaksi, kertas label, Microwife, plat KLT GF254, *chamber*, *hotplate*, *beaker glass*, gelas ukur, 10, 50, 100 ml, erlenmeyer, labu ukur 5, 10, 25, 50, 100 ml.

Bahan-bahan laboratorium dalam penelitian ini adalah daun Pegagan (*Centella asiatica* (L.) *Urban*), aquadest, Etanol 70%, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, media *nutrient broth* (NB), media *nutrient agar* (NA), Ciprofloxacin 500 mg, HCl, AlCl₃ 2%, Etyl asetat, Kloroform, Metanol, DMSO 0,1 %, Aquades, FeCl₃, etanol teknis 96%, kuersetin.

Pembuatan Ekstrak Pegagan (*Centella asiatica* (L.) *Urban*)

Pegagan diperoleh dari Balai Matera Medika Batu (Jawa Timur). Proses pembuatan ekstrak daun pegagan dilakukan dengan maserasi memakai etanol 70%. Optimasi dilakukan dengan cara maserasi, yaitu sebanyak 100 g sampel segar direndam ke dalam 250 ml etanol 70% selama 24 jam dengan beberapa kali pengadukan, setelah itu filtrat disaring dengan kertas saring dan kain untuk memisahkan ampas dan filtratnya. Filtrat yang didapatkan di tampung, dan untuk ampasnya dilakukan sebanyak dua kali remaserasi dengan jumlah dan perlakuan yang sama terhadap ampas yang didapatkan, skemudian filtrat dimasukkan ke dalam wadah dan dilanjutkan proses evaporasi. Setelah didapatkan ekstrak kental di hitung rendemen ekstrak menggunakan rumus :

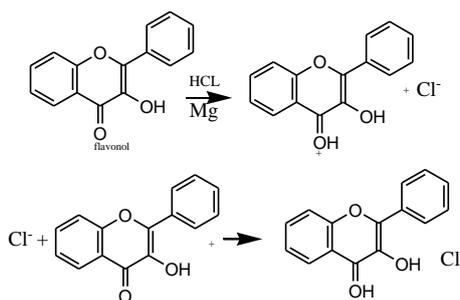
$$\text{Rendemen} : \frac{\text{bobot ekstrak}}{\text{bobot sampel}} \times 100 \%$$

Evaporasi Sampel

Evaporasi sampel dilakukan kepada semua sampel hasil maserasi yaitu ekstrak Pegagan, Hasil dari maserasi dimasukan ke dalam labu evaporasi, evaporasi dilakukan pada suhu 70^o C dan tekanan 80 Mbar hingga sampel menjadi pekat. Waktu yang dibutuhkan dalam proses ini adalah selama 3-4 jam untuk setiap sampel menjadi pekat, Ekstrak kental yang diperoleh dipanaskan di atas *water bath* dengan suhu \pm 80^o C sampai dihasilkan ekstrak kental hampir kering. Sebelum disimpan di dalam desikator, ekstrak kental akan ditimbang terlebih dahulu sebelum dilakukan pengujian.

Uji fitokimia flavonoid

1 mL ekstrak etanol pegagan dilarutkan ke dalam etanol 70% sebanyak 3 ml Ekstrak tersebut kemudian dikocok sembari dipanaskan, lalu disaring. Filtrat yang dihasilkan ditambahkan dengan 0,1 g bubuk magnesium dan beberapa tetes HCl pekat (Octaviani & Fadila, 2018). Kandungan flavonoid ditunjukkan dengan munculnya warna jingga, kuning, dan merah (Aziz, 2015).



Gambar 1 . Persamaan reaksi flavonoid

Penetapan Kadar Flavonoid

Pembuatan Kurva Standar Kuersetin. 25 mg Kuersetin ditambahkan labu ukur 25 ml, kemudian ditambahkan etanol 80% hingga mencapai volume 25 ml sebagai larutan induk (1000 µg/ml). Seri konsentrasi disiapkan dengan mulai dari konsentrasi 100 µg/ml, 80 µg/ml, 60 µg/ml, 40 µg/ml dan 20 µg/ml. Serapannya diukur pada panjang gelombang antara 300 – 600 nm pada spektrofotometer UV-Vis (Azizah, Kumolowati, & Faramayuda, 2017).

Pembuatan Larutan Uji Ekstrak Etanol. Ekstrak metanol daun pegagan diambil 250 mg kemudian ditambah 10 ml metanol. Kemudian disonikator selama 15 menit untuk mempercepat proses pelarutan, selanjutnya dilakukan penyaringan menggunakan kertas *whatman*, filtrat yang dihasilkan ditambahkan etanol sampai 10 ml.

Penentuan Kadar Flavonoid

Pembuatan larutan blanko dilakukan dengan penambahan 0,5 ml etanol. Kemudian ditambahkan etanol 95% sebanyak 1,5 ml, 0,1 ml aluminium klorida (AlCl₃) 10%, kalium asetat sejumlah 0,1 ml, dan ditambahkan akuades. Kemudian campuran larutan tersebut diinkubasi selama 30 menit. 1,0 ml ekstrak etanol (larutan uji) diambil dan ditambah etanol sampai 10 ml dalam labu ukur. 0,5 ml larutan tersebut ditambahkan dengan etanol 95% sejumlah 1,5 ml, 0,1 ml aluminium klorida (AlCl₃) 10%, kalium asetat 1 M sejumlah 0,1 ml, serta akuades. Campuran larutan ini didiamkan selama 30 menit pada suhu ruang sebelum diukur. Serapan diukur pada panjang gelombang 380 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Kadar flavonoid dihitung menggunakan rumus :

$$F = (c \times V \times f \times 10 - 6) / m \times 100\%$$

Keterangan :

F : jumlah flavonoid metode AlCl₃

c : kesetaraan Kuersetin (µg/ml)

V : volume total ekstrak

f : faktor pengenceran

m : berat sampel (g)

Pembiakan *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* dengan Media NB

Baik *E.coli* maupun *S.aureus* dibiakkan pada medium cair *nutrient broth* (NB) hingga 24 jam pada suhu 37°C untuk digunakan sebagai suspensi bakteri sebagai bakteri untuk pengujian.

Pengujian Daya Hambat Ekstrak Daun Pegagan terhadap Bakteri dengan Metode *Disc Diffusion Test*

Wadah media NA disediakan untuk 2 koloni, baik untuk *E. Coli* dan *S. Aureus*, kemudian disiapkan masing-masing cakram kertas yang sebelumnya dipanaskan di dalam oven suhu 70° C selama 15 menit kemudian cakram kertas dicelupkan ke media uji. Digunakan diameter cakram kertas ukuran 6 mm (Sari et al., 2017). Disiapkan semua wadah yang dibutuhkan termasuk menyiapkan 2 wadah erlenmeyer untuk media NA dibungkus menggunakan kertas koran dan dilakukan penyeterilan alat menggunakan autoklaf hingga mencapai suhu 121°C. Dibuat larutan uji dengan menimbang ekstrak 80 g dilarutkan dengan DMSO 0,1% sebanyak 10 ml. Larutan uji dibuat dalam beberapa konsentrasi, yaitu: 6400 µg/mL, 3200 µg/mL, 1600 µg/mL, 800 µg/mL, dan 400 µg/mL. Sebanyak 5 µL larutan uji dari 3 konsentrasi tersebut diteteskan ke dalam cakram kertas, ditunggu sampai kering yang menandakan pelarutnya sudah menguap. Didiamkan selama 5 menit cakram kertas yang telah berisi supernatan sebelum diletakkan dalam media uji, media agar yang sudah dingin diinokulasikan baik pada bakteri *E. coli* maupun *S.aureus* hingga merata, inkubasi pada suhu ruang selama 30 menit. Kontrol positif yang digunakan adalah antibiotik Ciprofloxacin 500 mg dengan konsentrasi 2000 µg/mL, dan kontrol negatif DMSO 0,1% yang digunakan sebagai pelarut. Cakram Kertas yang diinokulasikan selanjutnya diinkubasi hingga 24 jam. Zona bening yang terbentuk diamati dan diukur diameternya.

Pemantauan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Penentuan komponen senyawa dilakukan dengan menggunakan plat silika GF254 (fase diam). Pertama-tama, plat KLT diaktivasi dengan dipanaskan di dalam oven pada suhu 110 °C durasi 15 menit. Eluen yang digunakan adalah metanol : kloroform : asam asetat glasial perbandingan (5:2:1 tetes). Campuran fase gerak dijenuhkan ke dalam *chamber* lalu ditutup rapat selama 10 hingga 15 menit agar fase gerak tercampur sempurna. Ekstrak ditotolkan di plat yang selanjutnya dielus dengan campuran fase gerak. Plat dimasukkan pada *chamber* yang berisi fase gerak dan ditutup rapat hingga fase geraknya mencapai jarak ± 0,5 cm batas atas plat. Selanjutnya plat diambil dan dikeringkan di udara terbuka. Noda-noda diamati di bawah sinar UV 254 dan 366 nm. Nilai Rf dari spot yang terelihan dihitung dan diamati warna yang muncul.

Bioautografi

Cawan Petri diisi dengan 20 ml NA yang sudah diinokulasikan dengan 200 µg/mL suspensi bakteri, setelah mengering lempeng KLT atau plat silika dilekatkan ±20 menit pada media cawan petri yang sudah diinokulasikan dimana bakteri telah dibiakkan di dalamnya. Plat KLT diangkat setelah 20 menit dan cawan petri diinkubasi pada suhu 37° C hingga 24 jam. Pengamatan dilakukan pada zona bening yang terbentuk.

Uji Antibakteri dengan Penentuan Kadar Hambat Minimum (KHM)

Nilai KHM (Kadar Hambat Minimum) ditentukan dengan cara 2 ml media NB (*nutrient broth*) dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan dengan ekstrak uji dengan konsentrasi, 400 µg/mL, 800 µg/mL, 1.600 µg/mL, 3.200 µg/mL, 6.400 µg/mL sebanyak 1 ml, kemudian ke dalamnya ditambahkan 0,1 ml biakan bakteri *Escherichia coli*, dan perlakuan yang sama untuk *Staphylococcus aureus*, kemudian pada kontrol positif dibuat dengan menggunakan media NB sebanyak 2 ml yang ditambahkan dengan 1 ml kontrol positif antibiotik ciprofloxacin 500 mg, kemudian ditambahkan 1 ml biakan bakteri *Escherichia coli* dibuat kembali kontrol positif dengan perlakuan sama namun pada bakteri *Staphylococcus aureus*, Sedangkan untuk membuat kontrol negatif, dilakukan dengan menambahkan 2 ml biakan bakteri *Escherichia coli* ke dalam 2 ml media NB, dan 2 ml biakan bakteri *Staphylococcus aureus* Selanjutnya, dilakukan pengujian terhadap semua larutan uji, kontrol positif dan kontrol negatif diinkubasi selama 1 hari, kemudian diamati dan dibandingkan dengan kontrol dengan melihat tingkat kekeruhan pada larutan. Parameter yang digunakan adalah kekeruhan pada larutan uji.

Uji Antibakteri dengan Penentuan Nilai Kadar Bunuh Minimum (KBM)

Uji penentuan nilai KBM (Kadar Bunuh Minimum) pada penelitian ini dilakukan dengan cara menggoreskan sebanyak satu ose larutan uji akan digunakan untuk uji penentuan nilai Kadar Hambat Minimum (KHM) pada NA (*nutrient agar*) yang sudah disiapkan di cawan petri. Larutan yang digunakan adalah larutan uji penentuan KHM yang bening/tidak ada tanda-tanda pertumbuhan bakteri *E.coli* ataupun *S.aureus*. Kemudian diinkubasi selama 1 hari (24 jam). Ada dan tidak adanya pertumbuhan bakteri pada media agar merupakan parameter pada uji ini yang ditandai dengan ada atau tidaknya daerah atau bintik-bintik berwarna putih kekuningan pada media agar.

HASIL DAN PEMBAHASAN

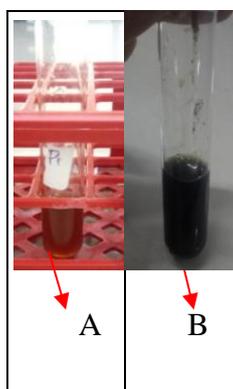
Hasil akhir dari maserasi setelah dilakukan proses evaporasi yaitu rendemen ekstrak kental yang dihasilkan sejumlah 21,806 %, karakteristik ekstrak yang dihasilkan berwarna coklat kehijauan dengan bau khas.

Proses ekstraksi yang dilakukan untuk mendapatkan ekstrak etanolik pegagan, yaitu dengan maserasi, dimana metode ekstraksi ini dilakukan dengan merendam simplisia dengan pelarut terpilih dan diinkubasi selama 24 jam. Pemilihan maserasi untuk proses ekstraksi bertujuan untuk mencegah perubahan struktur kimia yang mungkin terpengaruh oleh pemanasan. Maserasi menggunakan etanol 70% merupakan pelarut penyari yang terpilih karena etanol adalah salah satu pelarut universal sehingga dapat menarik berbagai senyawa lain yang memiliki karaktersistik polar. Kadar etanol 70% dinilai lebih efektif digunakan pada simplisia kering dengan kadar air yang rendah sehingga meningkatkan jumlah senyawa yang dapat diekstraksi. Ekstraksi menggunakan etanol 70% diketahui dapat menyari lebih banyak komponen metabolit golongan fenolik dan flavonoid (Dhanani, Shah, Gajbhiye, & Kumar, 2017).

Remaserasi dilakukan untuk mendapatkan ekstrak yang masih tersisa di dalam simplisia. Hal ini disebabkan karena kejenuhan pelarut diperbarui sehingga akan dapat menarik komponen lebih banyak dan diharapkan hasil rendemen akan lebih banyak juga. Senyawa aktif secara biologis biasanya terjadi pada konsentrasi rendah pada tanaman (Dhanani et al., 2017). Hasil maserasi adalah didapatkan filtrat berwarna hijau gelap atau hijau kehitaman yang akan dilanjutkan pada proses evaporasi untuk mendapatkan ekstrak kental.

Evaporasi dilakukan untuk mendapatkan ekstrak kental dari hasil proses ekstraksi menggunakan evaporator vakum pada suhu 70°C . Setelah dilakukan evaporasi, diperoleh ekstrak yang kental berwarna hijau tua dan memiliki bau khas, selanjut dilakukan penguapan pelarut untuk mendapatkan ekstrak kental sedikit kering.

Skrining fitokimia yang dilakukan adalah uji flavonoid, pengujian ini dilakukan dengan metode tabung yaitu dengan menimbang ekstrak etanol pegagan sebanyak 50 mg dimasukan tabung ependrof dilarutkan dengan etanol, kemudian dimasukan tabung reaksi dipanaskan dikocok dan diambil filtratnya, kemudian di tambahkan magnesium dan ditambahkan 1-5 tetes HCl. Munculnya warna jingga atau merah yang menunjukkan adanya kandungan flavonoid, didapatkan adalah warna merah bata yang terjadi selama 1-5 menit (Agfadila et al., 2017). Flavonoid termasuk dalam golongan fenol dimana apabila senyawa ini diberi suasana asam maka akan terbentuk larutan kuning kemerahan disebabkan terjadinya sistem konjugasi dari gugus aromatik. Penambahan HCl juga bertujuan untuk menghidrolisis flavonoid menjadi aglikonnya. Hidrolisis flavonoid merupakan suatu reaksi dimana senyawa flavonoid akan dilakukan oleh Mg^{2+} dengan terbentuknya kompleks antara flavonoid dengan ion magnesium, dimana terjadi perubahan menjadi warna kuning. Polihidroksi flavonon mengalami reduksi oleh logam magnesium dalam asam yang pada akhirnya membentuk garam benzopirilium yang berwarna merah, kuning, yang disebut garam flavilium. Uji fenol dilakukan dengan menimbang ekstrak etanol pegagan sebanyak 50 mg dimasukan tabung ependrof, kemudian dimasukan tabung reaksi dan ditambahkan satu sampai lima tetes FeCl_3 . Hasil untuk uji fenol didapatkan warna hijau kehitaman. Hasil tersebut menunjukkan bukti kualitatif adanya fenol akan membentuk warna hijau merah, ungu biru hitam pekat akibat reaksi dengan besi (III) klorida. Hasil uji dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. hasil uji fitokimia

Keterangan : a : (ekstrak pegagan + HCl) mengandung flavonoid

b : (ekstrak pegagan + FeCl_3) mengandung fenol

Hasil Uji Kadar Total Flavonoid

Total flavonoid ditentukan menggunakan metode Kolometri $AlCl_3$, dengan baku standar digunakan Kuersetin. Pengukuran panjang gelombang ditentukan dengan menggunakan seri konsentrasi yaitu 100 $\mu\text{g/mL}$, 80 $\mu\text{g/mL}$, 60 $\mu\text{g/mL}$, 40 $\mu\text{g/mL}$, dan 20 $\mu\text{g/mL}$. Nilai absorbansi ditentukan pada panjang gelombang maksimum 380 nm. Prinsip metode kolorimetri $AlCl_3$ yaitu adanya pembentukan kompleks $AlCl_3$ dengan gugus keto pada atom C-4 serta interaksi gugus hidroksi pada atom C-3 atau C-4 yang berdekatan pada struktur flavon dan flavonol (Desmiaty, Ratnawati, & Andini, 2009). Kurva kalibrasi yang diperoleh dari metode $AlCl_3$ kemudian dibandingkan dengan kuersetin.

Tabel 1. Hasil Pengukuran Flavonoid Metode $AlCl_3$

Serapan	Konsentrasi $\mu\text{g/mL}$	Kadar flavonoid
0,4190	36,8815	0,3688
0,4229	37,3947	0,3738
0,4340	38,8552	0,3885
	Rerata kadar flavonoid	0,3370
	SD	1,0240

Berdasarkan Tabel 1 ekstrak daun pegagan positif mengandung flavonoid dengan kadar flavonoid sebesar 0,3 %. Hasil kurva serapan kuersetin dilakukan perhitungan dengan menggunakan rumus $y = (bx+a)$ untuk mendapatkan kesetaraan kuersetin (c), volume total ekstrak sejumlah 25 ml, faktor pengenceran 1 kali dan jumlah gram sampel yang digunakan adalah 0,25 g ekstrak pegagan, kemudian dilakukan perhitungan. Total flavonoid yang didapat pada penelitian sebelumnya berbeda jumlahnya dari penelitian sebelumnya yang menghasilkan flavonoid sebesar 0,09 % dari ekstrak daun pegagan dengan pelarut air. Perbedaan hasil jumlah kandungan zat dapat terjadi disebabkan oleh penggunaan jenis pelarut yang berbeda, hal ini disebabkan pada penelitian sebelumnya pelarut ekstraksi yang digunakan adalah air (Agfadila et al., 2017). Dari hasil uji yang didapatkan dicurigai flavonoid yang terkandung adalah golongan flavonol jika dilihat dari hasil panjang gelombang maksimum yang didapat adalah 380 nm.

Tabel 2. Hasil Diameter Zona Bening *E. coli* Metode *Disc Diffusion Test*

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Diameter Zona hambat ($\pm\text{SD}$)
400	0,04 \pm 0,02
800	0,05 \pm 0,02
1600	0,03 \pm 0
3200	0,08 \pm 0,07
6400	0,1 \pm 0,05
Kontrol Positif	0,8 \pm 0,45
Kontrol Negatif	-

Prinsip Metode *Disc Diffusion Test* pada pengujian daya antibakteri melalui metode dengan meletakkan cakram kertas diatas permukaan media padat yang sebelumnya telah diinokulasikan bakteri uji. Ekstak dibuat dalam variasi konsentrasi $64 \times 10^2 \mu\text{g/mL}$, $32 \times 10^2 \mu\text{g/mL}$, $16 \times 10^2 \mu\text{g/mL}$, $8 \times 10^2 \mu\text{g/mL}$, $4 \times 10^2 \mu\text{g/mL}$, dan kontrol Ciprofloxacin 500 mg sebagai kontrol positif menunjukkan penghambatan pertumbuhan *Escherichia coli* yang ditandai terbentuknya zona bening di sekitar kertas cakram larutan uji dan kontrol positif meskipun daya hambat tidak lebih besar dari kontrol positif yaitu Ciprofloxacin 500 mg. Ciprofloxacin dipilih karena hasil penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Sumampouw (2018) mengatakan bahwa Ciprofloxacin merupakan antimikroba yang dipakai untuk pengobatan beberapa infeksi yang disebabkan oleh bakteri baik golongan gram positif maupun gram negatif.. Dalam jurnal ini juga dijelaskan bahwa Ciprofloxacin memiliki mekanisme penghambatan replikasi *Deoksiribosa Nucleat Acid* (DNA / Asam nukleat deoksiribosa). Ciprofolxacin bersifat bakteriosidal (dapat membunuh bakteri) dan menghambat replikasi DNA dengan memiliki afinitas yang kuat terhada enzim girase (sebuah tipe II topoisomerase) yang menyebabkan terpotongnya kromosom bakteri. Kerusakan ini bisa terjadi karena enzim yang diikat oleh antibiotik ini diperlukan untuk memisahkan DNA yang direplikasi (Sumampouw, 2018).

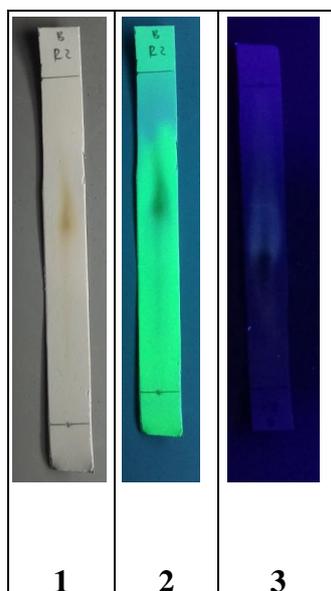
Tabel 3. Hasil diameter Zona Bening *S. aureus* Metode *Disc Diffusion Test*

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Diameter Zona Hambat ($\pm\text{SD}$)
400	0,03 \pm 0
800	0,03 \pm 0
1600	0,04 \pm 0,007
3200	0,04 \pm 0,021
6400	0,09 \pm 0,084
Kontrol Positif	0,82 \pm 0,403
Kontrol Negatif	-

Kontrol negatif pada penelitian ini tidak memberikan zona hambatan. Ini menunjukkan bahwasanya DMSO (pelarut ekstrak) dengan konsentrasi 0,1% tidak mempengaruhi pertumbuhan bakteri sehingga aktivitas hanya dari larutan uji. Dari Uji *Disc Diffusion Test* yang telah dilakukan menggunakan seri konsentrasi konsentrasi $64 \times 10^2 \mu\text{g/mL}$, $32 \times 10^2 \mu\text{g/mL}$, $16 \times 10^2 \mu\text{g/mL}$, $8 \times 10^2 \mu\text{g/mL}$, $4 \times 10^2 \mu\text{g/mL}$ secara visual dapat diamati bahwa ekstrak etanol daun pegagan menghambat aktivitas baik pada *E. coli* maupun *S. aureus*. Hal ini memberi kesimpulan konsentrasi ekstrak pegagan yang diberikan berbanding lurus dengan maka besarnya diameter zona hambat terhadap *E.coli* maupun *S. Aureus*.

Uji KLT untuk fase diamnya menggunakan plat Hasil dari pemantauan uji menggunakan KLT(Alen, Agresa, & Yuliandra, 2002) didapatkan Rf yang dapat dilihat pada tabel 4.7. RF dihitung setelah pengujian bioautografi hal tersebut dilakukan untuk mengetahui titik spot yang menghambat dan bersifat antibakteri, hasil spot yang dihasilkan pada bakteri *E.coli* memiliki nilai Rf tertinggi pada Replikasi pertama yaitu 0,71, dan pada bakteri *staphylococcus aureus* juga terdapat pada replikai 1 yakni dengan nilai Rf 0,73, hasil

pemantauan plat KLT menghasilkan spot berwarna kuning kecoklatan hampir hitam jika diamati dengan sinar tampak dan menghasilkan warna coklat tua atau hitam jika diamati dengan sinar UV hal tersebut dalam tabel menunjukkan ciri ciri flavonoid golongan flavonol, seperti pada Gambar 3.



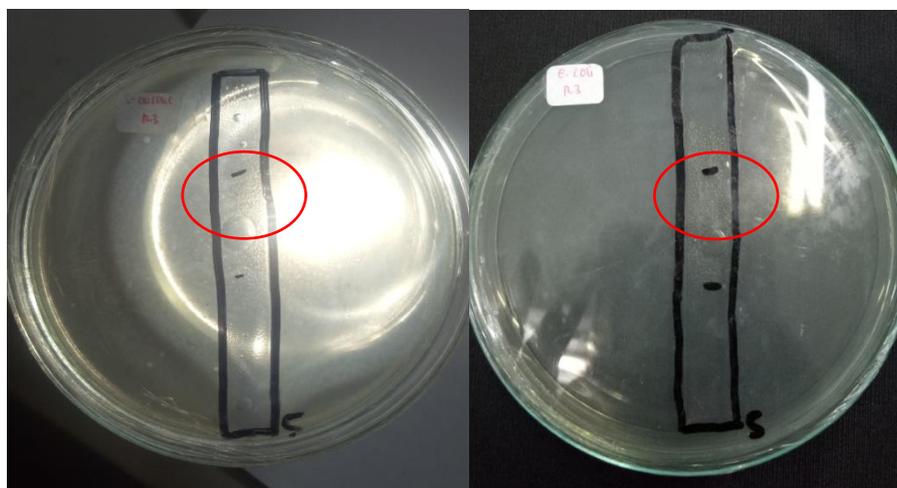
Gambar 3. Hasil Uji KLT diamati menggunakan fase gerak menggunakan metanol (5) : kloroform(2) : as.asetat glasial (1 tetes)

Prosedur yang di lakukan yaitu dengan menempelkan hasil elusi KLT yang memberikan titik spot seperti pada gambar 4.14 disiapkan media agar yang sudah dicampur dengan suspensi bakteri dan dituang kedalam cawan petri 20 ml dibiarkan hingga memadat, setelah media padat plat KLT yang sudah kering hasil dari elusi ditempelkan diatas permukaan agar secara perlahan dan ditandai dibagian bawah petri, didiamkan selama 3 jam. Setelah tiga jam plat KLT diangkat kembali secara perlahan dan aseptis, kemudian petri ditutup dan dilapisi plastik *wrap* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Parameter hambat yang digunakan untuk mengetahui hasil perlakuan terhadap bakteri ditandai terbentuknya zona bening pada spot hasil pemisahan.

Tabel 4. Hasil Rf yang didapat dari pemantauan KLT

Bakteri	RF
<i>E.coli</i>	0,71
	0,65
	0,5
<i>S.aureus</i>	0,73
	0,58
	0,62

Pada bakteri *S.aureus* didapatkan hasil zona bening pada area spot setelah dilakukan inkubasi selama ± 18 jam, terdapat lingkaran bulat bening di area sekitar spot, pada kedua bakteri uji berbeda dengan penelitian yang dilakukan sebelumnya oleh Agustin (2015) dalam penelitian yang dilakukan terhadap bakteri *E.coli* tidak memberikan hasil yang positif yaitu tidak terbentuknya zona jernih terhadap *E.coli* namun memberikan hasil yang positif terhadap bakteri *S.aureus*, hal tersebut dapat disebabkan karena beberapa hal, yakni fase gerak yang digunakan berbeda atau cara kerja yang dianggap kurang aseptis, dan lamanya penempelan plat KLT terhadap media agar, seperti yang disajikan pada Gambar 4. Pada bakteri *S.aureus* memberikan hasil yang positif dengan terbentuknya zona jernih atau zona hambat pada area spot pemisahan. Zona hambat yang terbentuk dapat dilihat secara visual, jika dibandingkan dengan antibiotik Ciprofloxacin efek antibakteri yang ditunjukkan tidak sebaik Ciprofloxacin, namun dengan dilakukan uji bioautografi dapat membantu memberikan informasi bahwa terdapat senyawa yang terdapat didalam pegagan yang bersifat sebagai antibakteri (Agustin,



2015).

Gambar 4. Hasil uji kualitatif bioautografi *E.coli* (Kiri) dan *S. Aureus* (Kanan)

Pada uji Kadar Hambat Minimum (KHM), konsentrasi larutan uji dapat menghambat bakteri *E.coli* dan *S.aureus*. Konsentrasi terkecil dari seri konsentrasi ekstrak tidak menunjukkan adanya kekeruhan setelah dibandingkan dengan kontrol (larutan uji yang tidak mengandung suspensi bakteri) adalah nilai Kadar Hambat Minimum (KHM). Pada penentuan kadar hambat minimum parameter yang digunakan adalah tingkat kekeruhan yang menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri pada campuran larutan setelah pembiakan hingga 24 jam. Pengamatan dilakukan secara visual dilihat adanya tingkat kekeruhan larutan, jika tidak ada kekeruhan atau selaput yang tumbuh maka dinyatakan tidak ada pertumbuhan bakteri, namun jika terlihat adanya selaput atau kekeruhan pada larutan maka dinyatakan adanya pertumbuhan bakteri.

Dari hasil uji larutan yang menggunakan konsentrasi $64 \times 10^2 \mu\text{g/mL}$, $32 \times 10^2 \mu\text{g/mL}$, $16 \times 10^2 \mu\text{g/mL}$, $8 \times 10^2 \mu\text{g/mL}$, $4 \times 10^2 \mu\text{g/mL}$, hasil yang tidak menunjukkan adanya

pertumbuhan bakteri adalah pada konsentrasi terkecil adalah 32×10^2 $\mu\text{g/mL}$. Larutan pada tabung tidak menunjukkan adanya pertumbuhan, tidak terdapat gumpalan selaput pertumbuhan bakteri, gumpalan selaput yang bila diamati akan melayang atau mengapung pada larutan merupakan pertanda pertumbuhan *E. coli*, sesuai dengan uji konfirmasi yang dilakukan oleh (Agfadila et al., 2017), bahwa *E. coli* memiliki bentuk koloni bulat, berwarna kuning hingga hijau, dan memiliki bentuk sel batang pendek. Sedangkan untuk warna larutan pada tabung menunjukkan warna yang berbeda dikarenakan konsentrasi ekstrak yang diberikan semakin meningkat sehingga pada konsentrasi tertinggi terlihat sedikit kuning kecoklatan, namun perbedaan warna tersebut tidak mempengaruhi hasil dari pengujian dikarenakan meskipun berbeda warna namun kelima tabung menunjukkan hasil jernih tidak terdapat pertumbuhan bakteri.

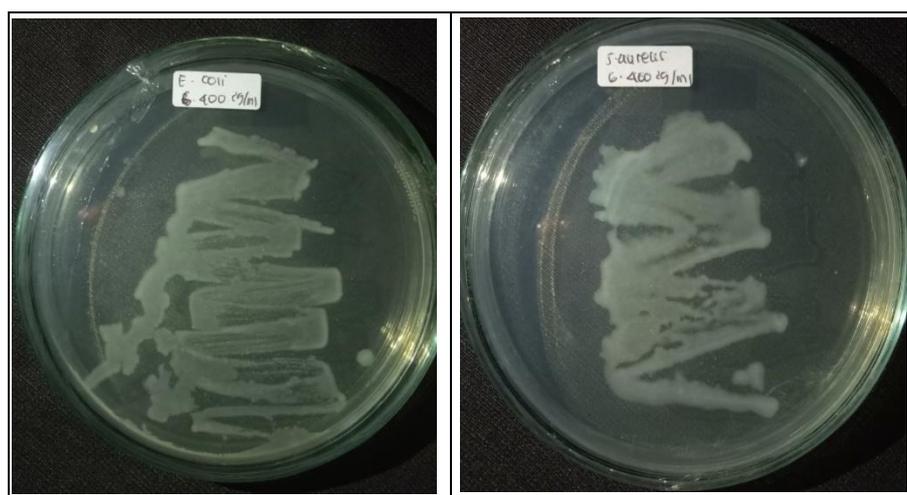
Dari hasil yang telah dilakukan didapatkan, bahwa konsentrasi 32×10^2 $\mu\text{g/mL}$ merupakan konsentrasi terkecil yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. Hal tersebut ditunjukkan dengan warna larutan tidak keruh dan tidak adanya selaput yang terbentuk di dalam larutan. Dengan demikian, larutan sampel pada tabung 1 yaitu larutan uji dengan seri konsentrasi ekstrak pegagan 32×10^2 $\mu\text{g/mL}$ dapat dinyatakan sebagai nilai KHM (Kadar Hambat Minimum). Dengan munculnya nilai KHM ini, maka dapat dinyatakan bahwa ekstrak pegagan efektif untuk digunakan sebagai antibakteri *E. coli*.

Dari hasil pengujian dengan bakteri *Staphylococcus aureus*. yang telah dilakukan didapatkan, bahwa konsentrasi 32×10^2 $\mu\text{g/mL}$ merupakan konsentrasi terkecil yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Ini ditunjukkan dengan warna larutan tidak keruh dan tidak adanya selaput yang terbentuk di dalam larutan. Pada konsentrasi 4×10^2 $\mu\text{g/mL}$, 8×10^2 $\mu\text{g/mL}$, 16×10^2 $\mu\text{g/mL}$ terdapat selaput gumpalan berwarna putih kekuningan yang tumbuh, dimana selaput tersebut akan melayang- layang apabila dilakukan pengocokan pada tabung reaksi, dan lama kelamaan akan mengendap, adanya selaput tersebut menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri *S.aureus* (Suryani, 2016). Dengan demikian, larutan sampel pada tabung pada konsentrasi 4×10^2 $\mu\text{g/mL}$, 8×10^2 $\mu\text{g/mL}$, 16×10^2 $\mu\text{g/mL}$ bakteri *S.aureus* masih dapat beradaptasi, berbeda dengan konsentrasi 32×10^2 $\mu\text{g/mL}$ dan 64×10^2 $\mu\text{g/mL}$ yang menampakkan larutan tidak ditumbuhi selaput seperti pada ketiga konsentrasi sebelumnya dengan demikian dapat di nyatakan yaitu larutan uji dengan seri konsentrasi ekstrak pegagan 32×10^2 $\mu\text{g/mL}$ dinyatakan sebagai nilai KHM (Kadar Hambat Minimum). Dengan munculnya nilai KHM ini, maka dinyatakan bahwa ekstrak pegagan juga efektif untuk penghambatan *S. aureus*. Hasil uji kadar hambat ekstrak pegagan terhadap bakteri *Escherichia coli* dapat disajikan pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil Uji Kadar Hambat Minimum

No. Tabung Reaksi	Seri Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Hasil Pengamatan	
		<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>
1.	$4 \times 10^2 \mu\text{g/mL}$	-	-
2.	$8 \times 10^2 \mu\text{g/mL}$	-	-
3.	$16 \times 10^2 \mu\text{g/mL}$	-	-
4.	$32 \times 10^2 \mu\text{g/mL}$	+	+
5.	$64 \times 10^2 \mu\text{g/mL}$	+	+
6.	Kontrol Negatif	-	-
7.	Kontrol Positif	+	+

Keterangan : (-) kekeruhan kurang dari pertumbuhan kontrol positif
 (+) kekeruhan sama dengan pertumbuhan kontrol positif



Gambar 5. Hasil uji KBM *E.coli* dan *S.aureus* konsentrasi $64 \times 10^2 \mu\text{g/mL}$

Hasil dari uji penentuan nilai KBM (Kadar Bunuh Minimum) seperti yang ditunjukkan pada Gambar 5. Hasil yang didapatkan diamati secara visual secara langsung. Hasil menunjukkan bahwa pada kedua cawan petri yang sudah diisi dengan media NA dan digores dengan larutan sampel seri konsentrasi $32 \times 10^2 \mu\text{g/mL}$ kemudian diinkubasi selama 18 jam bakteri *E.coli* dan *S.aureus* masih dapat bertumbuh yang ditandai dengan munculnya bercak-bercak pada media NA yang digunakan. Pada *E. coli* masih terdapat jelas pertumbuhan bakteri *E.coli* baik dari replikasi 1 hingga replikasi 2, dan pada *S.aureus* terdapat bercak putih kekuningan dengan ukuran tipis dibandingkan dengan replikasi dua. Kemudian dilakukan uji terhadap konsentrasi. Pada konsentrasi tertinggi yang digunakan yaitu $64 \times 10^2 \mu\text{g/mL}$ pada penelitian ini, bakteri *E.coli* dan *S.aureus* juga masih dapat beradaptasi dan bertumbuh. Hal tersebut menunjukkan bahwa semua konsentrasi yang diujikan terhadap bakteri *E.coli* maupun *S.aureus*. Dengan demikian, nilai KBM pada penelitian ini dapat dinyatakan lebih besar dari

konsentrasi 64×10^2 µg/mL.

SIMPULAN

Hasil penelitian yang telah dilakukan ini dapat disimpulkan bahwa Secara kualitatif nilai Kadar Hambat Minimum (KHM) ekstrak pegagan terhadap bakteri *Escherichia coli* adalah 32×10^2 µg/mL dan pada *Staphylococcus aureus* adalah 32×10^2 µg/mL. Nilai Kadar Bunuh Minimum (KBM) ekstrak pegagan terhadap *E. coli* maupun *S. aureus* adalah lebih dari 64×10^2 µg/mL. Ekstrak pegagan dapat dinyatakan memiliki daya hambat terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* dengan adanya zona jernih dengan diameter rata rata *Escherichia coli* $0,06 \pm 0,05$ mm dan *Staphylococcus aureus* $0,04 \pm 0,019$ mm.

Perlu diadakan penelitian yang lebih lanjut dengan pengembangan lebih lanjut untuk pemanfaatan daun pegagan sebagai antibakteri, pada pengujian menggunakan KLT perlu dilakukan optimasi fase gerak secara optimal agar di dapatkan spot yang sesuai.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terima kasih kepada Universitas Ma Chung dan Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat Universitas Ma Chung, Program Studi S1 Farmasi Universitas Ma Chung atas fasilitas dan kesempatan yang diberikan sehingga penelitian ini dapat dilaksanakan.

DAFTAR PUSTAKA

- Agfadila, T., W, P. A. S., & Puspawati, N. N. (2017). Kemampuan Daya Hambat Ekstrak Daun Pegagan (*Centella asiatica* (L .) Urban) terhadap Pertumbuhan *Escherichia coli* ATCC 8739. *Jurnal ITEPA*, 6(2), 21–29.
- Agustin, S. (2015). Isolasi dan Identifikasi golongan Senyawa aktif penangkap radikal bebas, Ultraviolet protection, dan antibakteri pada ekstra etanolik daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban). *Universitas Sanata Dharma*, 1–118.
- Alen, Y., Agresa, F. L., & Yuliandra, Y. (2002). Analisis Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Aktivitas Antihiperurisemia Ekstrak Rebung *Schizostachyum brachycladum* Kurz (Kurz) pada Mencit Putih Jantan. *Jurnal Sains Farmasi & Klinis*, 3(May), 1223. <https://doi.org/10.1109/TEST.2002.1041926>
- Aziz, M. A. (2015). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana* L) terhadap Bakteri *Escherichia coli* ATCC 11229 DAN *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 secara In Vitro (Vol. 16). <https://doi.org/10.1377/hlthaff.2013.0625>
- Azizah, D. N., Kumolowati, E., & Faramayuda, F. (2017). Penetapan Kadar Flavonoid Metode AlCl₃ pada Ekstrak Metanol Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.). *Kartika Jurnal Ilmiah Farmasi*, 2(2), 45–49. <https://doi.org/10.26874/kjif.v2i2.14>
- Besung, I. N. K. (2009). Pegagan (*Centella asiatica*) Sebagai Alternatif Pencegahan Penyakit Infeksi pada Ternak. *Buletin Veteriner Udayana*, 1(2), 61–67.
- Choma, I. M., & Grzelak, E. M. (2011). Bioautography detection in thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1218(19), 2684–2691. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.12.069>

- Desmiaty, Y., Ratnawati, J., & Andini, P. (2009). Penentuan jumlah flavonoid total ekstrak etanol daun buah merah (p. *Seminar Nasional POKJANAS TOI XXXVI*, 1–8.
- Dhanani, T., Shah, S., Gajbhiye, N. A., & Kumar, S. (2017). Effect of extraction methods on yield, phytochemical constituents and antioxidant activity of *Withania somnifera*. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S1193–S1199. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.02.015>
- Octaviani, M., & Fadila, F. (2018). Uji Aktivitas Antijamur Sari Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) Terhadap Jamur *Candida albicans*. *Jurnal Katalisator*, 3(2), 125. <https://doi.org/10.22216/jk.v3i2.3309>
- Sari, R., Muhani, M., & Fajriaty, I. (2017). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Gaharu (*Aquilaria microcarpa* Baill.) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Proteus mirabilis*. *Pharm Sci Res*, 4(3), 143–154.
- Sumampouw, O. J. (2018). Uji Sensitivitas Antibiotik terhadap Bakteri *Escherichia coli* Penyebab Diare Balita di Kota Manado (The Sensitivity Test of Antibiotics to *Escherichia coli* was Caused The Diarrhea on Underfive Children in Manado City). *Journal of Current Pharmaceutical Sciences*, 2(1), 105.
- Suryani, S. (2016). Isolasi Bakteri Patogen pada Pasien Penderita Infeksi telinga Chronic supparative otitis media (OMSK). *Jurnal Katalisator*, 1(2). <https://doi.org/10.22216/jk.v1i2.1005>