

**FRAKSI ETANOL, KLOOROFORM, DAN N-HEKSAN BUNGA KAMBOJA PUTIH
(Plumeria acuminata L.) SEBAGAI ANTIBAKTERI TERHADAP
Escherichia coli dan Staphylococcus aureus
DENGAN BIOAUTOGRAFI**

*Ethanol, Chloroform, and N-hexane Fractions Of Frangipani Flowers
(Plumeria acuminata L.) As Antibacterial Against
Escherichia coli and Staphylococcus aureus
With Bioautography*

Yuli Wahyu Trimulyani, Akhmad Rokiban, Meilinda Sari
Jurusan Farmasi MIPA, Universitas TulangBawang Lampung

Email : yuliwahyu.bio@gmail.com

Abstract

Frangipani flowers (Plumeria acuminata L.) Flower is one of the plants that has antibacterial properties. Compounds that act as antibacterial are flavonoids and tannins. The purpose of this study was to prove the antibacterial activity of ethanol, chloroform, and n-hexane fractions of Frangipani flowers (Plumeria acuminata L.) flower as antibacterial against E. coli and S. aureus with Bioautography. The process of extracting plumeria acuminata L. flowers was carried out by maceration method using 70% ethanol. The extract was continued with the fractionation process with ethanol, n-hexane and chloroform solvents. Antibacterial activity testing using the well method with concentrations of 20%, 40%, 60%, 80%, 100%, positive chloramphenicol control, and negative aquadest control. The compound content test used the Thin Layer Chromatography (TLC) method with the mobile phase of chloroform: methanol: water (2:5:3) (v/v). Bioautography test using the contact method, namely the elution TLC plate, was placed on the NA medium containing a bacterial suspension for 3 hours. The biggest antibacterial test results of ethanol fraction of plumeria acuminata L. flowers were at a concentration of 100% with a diameter of inhibition zone of 13.55 mm in E. coli while 14.15 mm S. aureus. The results of TLC showed the presence of flavonoids with a price of Rf 0.70 and tannin at a price of Rf 0.68. Bioautography results showed a inhibition zone with a price of Rf 0.70 in E. coli and S. aureus which are flavonoid compounds. Based on the results of the research that has been done it can be concluded that the ethanol fraction of white frangipani flowers has antibacterial activity against E.coli and S. aureus, while the chloroform fraction and n-hexane fraction do not have antibacterial activity. The active compounds that act as antibacterial are flavonoids and tannin, but the ones that provide antibacterial effects are flavonoids with an Rf value of 0.70.

Keywords: *Bioautography, Escherichiacoli, Frangipani flowers, Staphylococcusaureus, TLC*

Abstrak

Bunga Kamboja Putih (*Plumeria acuminata L.*) merupakan salah satu tanaman yang memiliki khasiat sebagai antibakteri. Senyawa yang berperan sebagai antibakteri adalah flavonoid dan tanin. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk membuktikan adanya aktivitas antibakteri fraksi etanol, kloroform, dan n-heksan bunga kamboja putih sebagai antibakteri terhadap *E.coli* dan *S.aureus* dengan Bioautografi. Proses ekstraksi bunga kamboja putih dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Ekstrak dilanjutkan dengan proses fraksinasi dengan pelarut etanol, n-heksan, dan kloroform. Pengujian aktivitas antibakteri

menggunakan metode sumuran dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, 100%, kontrol positif kloramfenikol, dan kontrol negatif aquadest. Uji kandungan senyawa menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan fase gerak kloroform:metanol:air (2:5:3) (v/v). Uji bioautografi menggunakan metode kontak yaitu plat KLT hasil elusi diletakkan diatas media NA yang berisi suspensi bakteri selama 3 jam. Hasil uji antibakteri fraksi etanol bunga kamboja putih paling besar yaitu pada konsentrasi 100% dengan diameter zona hambat sebesar 13,55 mm pada *E.coli* sedangkan 14,15 mm pada *S.aureus*. Hasil KLT menunjukkan adanya senyawa flavonoid dengan harga Rf 0,70 dan senyawa tanin dengan harga Rf 0,68. Hasil Bioautografi menunjukkan adanya zona hambat dengan harga Rf 0,70 pada bakteri *E.coli* dan *S.aureus* yang merupakan senyawa flavonoid. Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa fraksi etanol bunga kamboja putih memiliki aktivitas antibakteri terhadap *E.coli* dan *S.aureus*, sedangkan fraksi kloroform dan fraksi n-heksan tidak memiliki aktivitas antibakteri. Senyawa aktif yang berperan sebagai antibakteri adalah flavonoid dan tanin, namun yang memberikan efek antibakteri adalah senyawa flavonoid dengan harga Rf 0,70.

Kata Kunci : Bunga Kamboja Putih, Bioautografi, *Escherichia coli*, KLT, *Staphylococcus aureus*.

PENDAHULUAN

Penyakit infeksi merupakan salah satu penyebab penyakit terutama di daerah tropis seperti Indonesia karena keadaan udara yang berdebu, temperatur yang hangat, dan lembab sehingga mikroba dapat tumbuh subur. Keadaan tersebut ditunjang dengan keadaan sanitasi yang buruk sehingga lebih memudahkan penyakit infeksi semakin berkembang. Sanitasi yang buruk dapat menyebabkan penyakit diare [1]. Diare merupakan salah satu penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* yang masih menjadi masalah utama dalam kesehatan masyarakat. Gejala klinis yang menandakan seseorang mengalami diare diantaranya terjadi peningkatan frekuensi defekasi, feses terlihat encer, kadang terdapat lendir dan darah pada feses [2]. Diare juga dapat berpotensi mengakibatkan kematian. Menurut Departemen Kesehatan Republik Indonesia menunjukkan bahwa prevalensi angka kematian yang disebabkan oleh diare sebesar 3,04%. Secara global terjadi peningkatan kejadian diare dan kematian akibat diare, pada tahun 2015 diare

menyebabkan sekitar 688 juta orang sakit dan pada tahun 2017 meningkat hampir 1,7 miliar [3]. Bakteri *E.coli* adalah bagian flora normal gastrointestinal manusia. Pada kondisi tertentu bakteri *E.coli* menyebabkan penyakit diare, infeksi saluran kemih, pneumonia dan meningitis pada bayi baru lahir serta infeksi luka dalam. Sedangkan *S. aureus* merupakan bakteri gram positif yang merupakan anggota flora normal kulit, selaput lendir, saluran pernafasan, dan saluran cerna [4].

Pengobatan terhadap serangan infeksi bakteri dapat dilakukan dengan penggunaan antibiotik, akan tetapi penggunaan antibiotik secara besar-besaran adalah faktor utama terjadinya resistensi. Bakteri yang resisten terhadap antibiotik tidak akan terbunuh oleh antibiotik, lalu berkembang biak dan menyebar sehingga menjadi lebih berbahaya. Seiring dengan meningkatnya resistensi bakteri, harus pula diimbangi dengan penemuan obat baru [5]. Beberapa bakteri telah mengalami resistensi dengan antibiotik tertentu, oleh karena itu alternatif pengobatan yang berasal dari alam menjadi semakin nyata [6].

Salah satu tanaman obat yang dapat digunakan adalah Bunga Kamboja Putih yang merupakan jenis bunga yang banyak ditanam di Indonesia, khususnya pulau Jawa dan Bali. Bunga kamboja merupakan bunga yang berbau sangat harum dan cukup awet [7]. Bunga ini sering digunakan pada acara-acara adat juga keagamaan karena mengeluarkan aroma yang khas dan warnanya yang indah. Bunga kamboja ada yang berkelopak besar atau juga kecil dan ada yang berwarna putih, kuning, dan merah [8]. Kamboja putih diketahui memiliki kandungan zat aktif antara lain steroid, saponin, flavonoid, tanin, alkaloid, dan terpenoid [9].

Bunga kamboja putih dimanfaatkan sebagai obat tradisional seperti daunnya sebagai antioksidan [10]. Buah dan kulit batang berefek antiinflamasi, diuretik, antibakteri, antifungi, dan antivirus [11]. Tumbuhan ini mempunyai aktivitas antibakteri. Berdasarkan penelitian sebelumnya kamboja putih memiliki beberapa aktifitas antibakteri baik gram positif maupun negatif. Ekstrak etil asetat dari kulit batang kamboja kuning (*P.alba*) mampu menghambat pertumbuhan *E. coli* dan *S.aureus* pada konsentrasi 3% memberikan zona penghambatan 14,20 mm dan 15,16 mm [12]. Ekstrak etanol daun kamboja kuning mampu menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* pada konsentrasi 30 ppm merupakan konsentrasi yang paling rendah dengan zona hambat sebesar 1,3 mm [13]. Ekstrak n-heksan daun kamboja merah (*P.rocea*) mampu menghambat pertumbuhan *E. coli* dan *S. aureus* dengan aktivitas tertinggi pada daun yaitu 19,7% dan 13,3% [14]. Ekstrak etanol bunga kamboja putih terhadap *E.coli* dengan konsentrasi tertinggi 5% dapat menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* dan *S.aureus* dengan diameter zona hambat 8 mm. Sejauh ini penelitian bungakambojaputih hanya sebatas ekstraknya saja, belum dilakukan fraksinasi [15].

Tujuan penelitian ini untuk membuktikan aktivitas antibakteri dan

mengetahui senyawa aktif antibakteri dari fraksi etanol, kloroform, dan n-heksan bunga kamboja putih (*Plumeria acuminata* L.) yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* dan *S. aureus*.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan adalah Alat yang akan digunakan pada penelitian ini adalah cawan petri, botol gelap, jangka sorong, *rotary evaporator*, pipet mikro, pipet tetes, pipa kapiler, jarum ose, autoklaf, tabung reaksi, rak tabung reaksi, inkubator, erlenmeyer, gelas ukur, gelas beker, timbangan, lemari pendingin, *blue tip*, bunsen, cawan porselin, alumunium foil, tisu, kapas, kertas saring, kertas label, corong pisah, gunting, benang kasur, kain kasa, lampu UV, *LAF (Laminar Air Flow)*, *chamber*, plat silika gel $G_{60}F_{254}$, bunga kamboja putih (*Plumeria acuminata* L.), *E. coli*, *S. aureus*, *Nutrien Agar* (NA), *Nutrien Broth* (NB), Kloramfenikol, aquadest (H_2O), etanol 70% (C_2H_6O), kloroform ($CHCl_3$), n-Heksan ($CH_3(CH_2)_4CH_3$), amoniak (NH_3), Liebermann burchard, clorida ($FeCl_3$) dan Bouchadat.

Pembuatan Ekstrak dan Fraksi Bunga Kamboja Putih

Simplisia bunga kamboja putih sebanyak 500 g dimasukkan dalam wadah berwarna gelap kemudian dimaserasi dengan cairan penyari etanol 70% sampai simplisia terendam sempurna dalam pelarut sebanyak 6 kali maserasi. Selanjutnya maserat diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak cair. Ekstrak yang diperoleh difraksinasi dengan ditambahkan pelarut etanol dan n-heksan dengan perbandingan 1:1 hingga didapat fraksi etanol dan fraksi n-heksan. Kemudian fraksi etanol difraksinasi kembali dengan penambahan pelarut kloroform dengan perbandingan 1:1 hingga didapat fraksi etanol dan kloroform. Kemudian fraksi etanol yang diperoleh diuapkan dengan *rotary evaporator* hingga didapat fraksi cair.

Uji Daya Antibakteri

Uji daya antibakteri menggunakan metode difusi yaitu metode lubang. Cawan petri steril dituangkan 100µl suspensi masing-masing bakteri *E. coli* atau *S. aureus* lalu ditambahkan media NA yang belum memadat, dihomogenkan kemudian dibiarkan memadat. Beberapa lubang dibuat pada media dengan menggunakan *blue tip*. Kemudian dimasukkan larutan uji fraksi bunga kamboja putih dengan menggunakan fraksi etanol, n-heksan, dan kloroform. Kloramfenikol kontrol positif dan aquadest sebagai kontrol negatif ke dalam lubang-lubang tersebut dengan menggunakan mikropipet. Semua cawan petri diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Selanjutnya dilakukan pengamatan dan pengukuran zona hambat yang terbentuk disekeliling lubang sumuran dengan menggunakan jangka sorong.

Uji KLT

Sampel yang digunakan yaitu fraksi etanol, kloroform, dan n-heksan konsentrasi 100% bunga kamboja putih. Fase diam yang digunakan yaitu plat silika gel G₆₀F₂₅₄ dengan ukuran 7 cm x 2,5 cm yang diaktifkan terlebih dahulu dengan pemanasan dalam oven pada suhu 100°C selama 30 menit. Fase gerak yang digunakan fraksi etanol menggunakan kloroform:metanol: air (2:5:3) (v/v/v), fraksi kloroform menggunakan kloroform; methanol dengan perbandingan (9:1) (v/v), kemudian fraksi n-heksan menggunakan n-heksan:kloroform dengan perbandingan (7:3) (v/v).

Kemudian plat silika ditotolkan dengan sampel menggunakan pipa kapiler secara hati-hati. Diamkan beberapa menit hingga kering dan dimasukkan ke dalam *chamber* yang telah jenuh dengan fase gerak yang digunakan. Plat KLT dikeluarkan dari *chamber*, noda yang tampak pada kromatogram kemudian diamati dibawah lampu UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Bercak dideteksi dengan pereaksi semprot Bouchardat untuk

alkaloid dan akan menunjukkan warna merah, jingga dan coklat pekat, Amonia untuk flavonoid menunjukkan warna kuning, hijau, coklat atau merah muda, FeCl₃ untuk tanin akan menghasilkan warna hijau, merah, ungu, biru atau hitam kuat, Liebermann-Burchard untuk saponin [16].

Uji Bioautografi

Sampel yang digunakan yaitu fraksi etanol, kloroform, dan n-heksan konsentrasi 100% bunga kamboja putih yang memiliki zona hambat pada uji daya antibakteri. Plat silika terlebih dahulu diaktivasi dengan cara di oven pada suhu 100°C selama 30 menit kemudian plat ditotolkan dengan menggunakan pipa kapiler. Fraksi etanol, kloroform, dan n-heksan ditotolkan. Dimigrasikan kedalam *chamber* KLT yang telah berisi fase gerak. Setelah proses KLT selesai, plat KLT ditempelkan pada permukaan media agar dalam petri yang masing-masing telah diinokulasi dengan suspensi bakteri *E. coli* dan *S. aureus*. Setelah 3 jam lempeng tersebut diangkat dan dipindahkan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam lalu amati zona hambatan yang terbentuk hitung nilai Rf nya. Kemudian bandingkan hasil nilai Rf pada plat KLT Bioautografi dengan hasil nilai Rf pada plat KLT.

Analisis Data

Data hasil pengamatan fraksi etanol, kloroform, dan n-heksan bunga kamboja putih terhadap aktivitas antibakteri *E. coli* dan *S. aureus* dianalisis menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 3 (tiga) kali pengulangan. Data yang diperoleh kemudian dianalisis dengan metode Analisis Of Varian (ANOVA) dengan menggunakan software SPSS versi 22.

HASIL DAN PEMBAHASAN

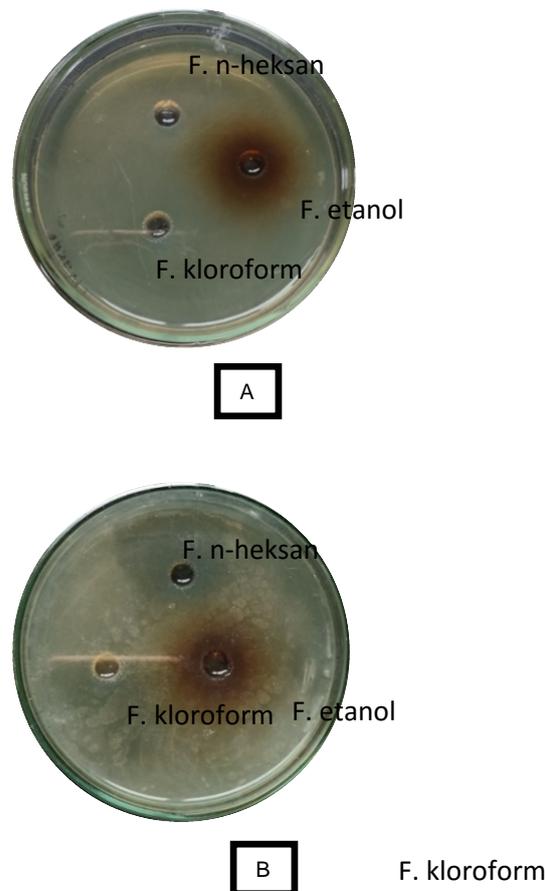
Ekstrak Dan Fraksi Bunga Kamboja Putih

Simplisia bunga kamboja putih sebanyak 500 gram diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Metode maserasi dipilih karena memiliki kelebihan tersendiri diantaranya pengerjaannya cukup sederhana, murah, mudah dilakukan dan tidak menggunakan suhu tinggi yang memungkinkan dapat merusak senyawa-senyawa kimia yang terdapat dalam ekstrak [17]. Maserat di rotary evaporator sehingga mendapatkan ekstrak cair sebanyak 300 ml.

Kemudian dilakukan proses fraksinasi dengan menggunakan metode cair-cair. Fraksinasi dilakukan untuk memisahkan senyawa yang bersifat polar, semi polar, dan non polar. Pada penelitian ini digunakan ketiga pelarut yang dimulai dari pelarut etanol (polar), pelarut n-heksan (non polar), dan kloroform (semi polar). Fraksinasi pada penelitian ini dilakukan sebanyak tiga kali. Fraksi pertama menggunakan ekstrak etanol dan n-heksan yakni untuk memisahkan senyawa polar dan non polar. Fraksi kedua menggunakan fraksi etanol dan fraksi kloroform, senyawa polar akan tertarik dengan etanol sedangkan senyawa semi polar akan tertarik dengan kloroform. Fraksi etanol yang diperoleh berwarna coklat pekat berbeda dengan fraksi kloroform yang berwarna jernih muda dan fraksi n-heksan yang berwarna jernih. Hal ini terjadi karena terdapat banyaknya senyawa yang bersifat polar dalam bunga kamboja putih sehingga akan lebih tertarik kedalam fraksi etanol. Sedangkan senyawa-senyawa yang bersifat non polar dan semi polar sangat sedikit dalam sampel tersebut terlihat dari warna fraksi yang lebih jernih dibandingkan fraksi etanol.

Hasil Uji Daya Antibakteri

Hasil uji pendahuluan penelitian dengan menggunakan ketiga fraksi yaitu fraksi etanol, kloroform, dan n-heksan dengan konsentrasi 100% yang menimbulkan zona hambat hanya pada fraksi etanol. Dapat dilihat pada gambar 1



Gambar 1. Hasil uji antibakteri fraksi etanol, kloroform, dan n-heksan bunga kamboja putih terhadap bakteri (A). *E.coli* (B). *S.aureus* konsentrasi 100%

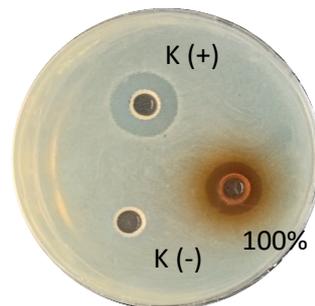
Hasil penelitian uji daya antibakteri menunjukkan fraksi etanol menunjukkan diameter zona hambat dengan terbentuknya zona hambat disekitar sumuran. Pada fraksi kloroform dan fraksi n-heksan bunga kamboja putih tidak menunjukkan diameter zona hambat terhadap bakteri *E.coli* dan *S.aureus*. Pada fraksi kloroform dan fraksi n-heksan diduga dapat menarik senyawa semipolar dan nonpolar ternyata tidak tertarik. Sehingga tidak ada senyawa yang bersifat sebagai agen antibakteri. Hanya senyawa etanol yang dapat menarik senyawa polar dan sebagai agen antibakteri. Hal ini terbukti dengan tidak terbentuknya zona hambat disekitar sumuran fraksi kloroform dan n-heksan dengan konsentrasi fraksi 100%, dengan demikian hasil dari uji pendahuluan menggunakan konsentrasi 100%

digunakan sebagai dasar untuk melanjutkan penelitian selanjutnya dengan menggunakan konsentrasi yang diturunkan menjadi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%.

Uji daya antibakteri bunga kamboja putih dilakukan dengan menggunakan fraksi etanol dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100% dengan kloramfenikol sebagai kontrol positif, dan aquadest sebagai kontrol negatif yang kemudian diujikan dengan ke dua jenis bakteri yang berbeda yaitu *E.coli* yang mewakili gram negatif dan *S.aureus* yang mewakili gram positif dengan menggunakan metode sumuran dan media NA dalam uji antibakteri. Hasilnya dapat dilihat pada gambar 1 dan gambar 2.



Gambar 2. Hasil uji antibakteri fraksi etanol bunga kamboja putih terhadap bakteri *E.coli* dengan konsentrasi 20%,40%, 60%, 80%,100%K+ Kloramfenikol dan K Aquadest



Gambar 3. Hasil uji antibakteri fraksi etanol bunga kamboja putih terhadap bakteri *S.aureus* dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, 100% K+ Kloramfenikol dan K- Aquadest

Hasil penelitian uji daya antibakteri menunjukkan bahwa fraksi etanol bunga kamboja putih dapat menghambat pertumbuhan bakteri gram negatif *E.coli* dan bakteri gram positif *S.aureus*. Hal ini terbukti dengan terbentuknya zona hambat disekitar sumuran dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, 100%. Data diameter zona hambat dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Rata-rata diameter zona hambat fraksi etanol terhadap bakteri *E.coli* dan *S.aureus*.

Perlakuan	Zona Hambat (mm)		Respon Hambat (29)	
	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>
K-	0±0,00a	0±0,00a	Lemah	Lemah
K 20%	9.43±0,04b	9.11±0,43b	Sedang	Sedang
K 40%	9.80±0,27b	9.83±0,62b	Sedang	Sedang
K 60%	11.09±0,21c	10.61±0,06c	Kuat	Kuat
K 80%	12.67±0,02d	12.13±0,52d	Kuat	Kuat
K 100%	13.55±0,50e	14.15±0,85e	Kuat	Kuat
K +	14.78±0,43f	17.90±0,73f	Kuat	Kuat

Keterangan : Angka-angka pada kolom yang sama diikuti huruf tika atas yang sama (dibelakang simpangan baku) tidak berbeda nyata pada taraf uji Tukey 5%.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi etanol bunga kamboja putih memiliki daya hambat antibakteri terhadap *E.coli* dan *S.aureus*. Hal tersebut dikarenakan didalam bunga kamboja putih mengandung senyawa flavonoid dan tanin yang bersifat sebagai antibakteri.

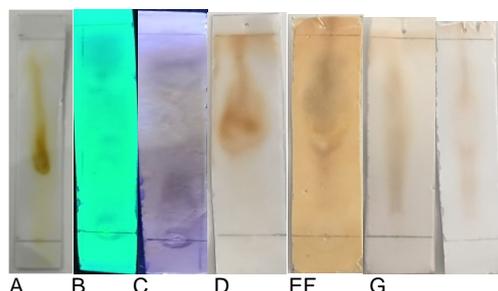
Hasil Uji KLT

KLT yaitu metode yang digunakan untuk memisahkan senyawa secara fisika-kimia berdasarkan dengan komponen fase diam dan fase gerak. Analisis KLT bertujuan untuk mengetahui kandungan senyawa dari fraksi etanol, fraksi n-heksan, dan fraksi kloroform bunga kamboja putih. Sebelum dilakukan penotolan sampel, fase diam yang akan digunakan diaktivasi terlebih dahulu didalam oven selama 30 menit dengan suhu 100°. Hal ini bertujuan untuk menghilangkan kandungan air pada plat sehingga proses absorpsi dari fase diam maksimal. Kemudian chamber yang akan digunakan dijenuhkan terlebih dahulu menggunakan fase gerak terbaik. Tujuan penjuhan chamber yaitu mencegah terjadinya penguapan pelarut. Tertahannya uap eluen akan mempengaruhi proses distribusi fase diam menjadi semakin baik dan hasilnya pun teliti. Penjuhan chamber juga bertujuan untuk menghilangkan uap air dan gas lain yang mengisi fase penyerap yang akan menghalangi laju eluen.

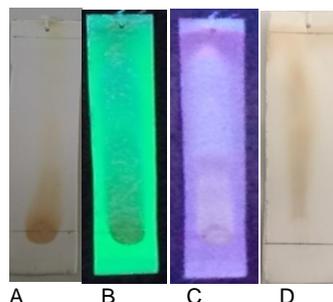
Optimasi fase gerak dilakukan dengan berbagai perbandingan, dan didapatkan pemisahan paling baik yaitu kloroform:metanol:air (2:5:3) (v/v/v) untuk fraksi etanol [18]. Fase gerak untuk fraksi kloroform didapatkan pemisahan paling baik yaitu kloroform;methanol (9:1) [19]. Fase gerak untuk fraksi n-heksan didapatkan pemisahan paling baik yaitu dengan menggunakan fase gerak n-heksan: kloroform (7:3) [20]. Fase gerak kloroform, metanol, dan air dipilih karena disesuaikan dengan sifat kelarutan senyawa yang dianalisis yaitu bersifat polar, fase gerak kloroform dipilih karena disesuaikan dengan sifat kelarutan yang

dianalisis yaitu bersifat semipolar dan fase gerak n-heksan dipilih karena disesuaikan dengan sifat kelarutan yang dianalisis yaitu bersifat non polar.

Plat KLT yang telah elusi dengan fase gerak kloroform:metanol:air (2:5:3) (v/v/v) untuk fraksi etanol dan fase gerak kloroform:metanol (9:1) untuk fraksi kloroform fase gerak n-heksan: kloroform (7:3) untuk fraksi n-heksan kemudian diamati bercaknya di UV 254 dan di UV 366 nm. Selanjutnya bercak tadi ditetesi dengan reagen semprot yaitu amoniak untuk senyawa flavonoid dan akan menunjukkan warna kuning, jingga atau merah, Libermann-Bouchard akan menghasilkan warna ungu untuk senyawa saponin, Bouchardat untuk alkaloid dan akan menunjukkan warna merah, jingga, dan coklat. $FeCl_3$ untuk tanin akan menghasilkan warna hijau, merah, ungu, biru atau hitam kuat.

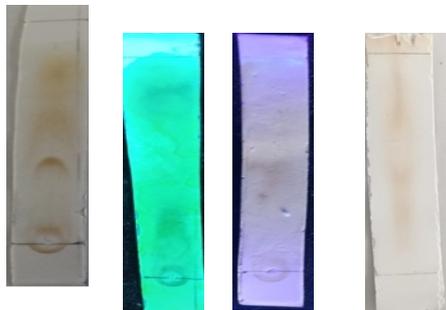


Gambar 4. Hasil Penampang Bercak Uji Kromatografi Lapis Tipis Fraksi Etanol Bunga Kamboja Putih Dengan Fase Gerak Kloroform:Metanol:Air (2:5:3) A:sinar tampak, B : UV 254, C : UV 366, D : Ammonia, (Flavonoid) E : $FeCl_3$ (Tanin) F : Bourchardat (Alkaloid). G : Lieberman (Terpenoid)



Gambar 5. Hasil Penampang Bercak Uji Kromatografi Lapis Tipis Fraksi Kloroform

Bunga Kamboja Putih Dengan Fase Gerak Kloroform:Metanol (9:1). A : sinar tampak, B : UV 254, C : UV 366, D : Bouchardat (Alkaloid)



A B C D
Gambar 6. Hasil Penampang Bercak Uji Kromatografi Lapis Tipis Fraksi n-heksan Bunga Kamboja Putih Dengan Fase gerak n-heksan:kloroform (7:3) A : sinar tampak, B : UV 254, C : UV 366, D : Lieberman Burchard (Terpenoid)

Pada gambar 5 menunjukkan bahwa setelah disemprotkan Bouchardat untuk senyawa alkaloid tidak menunjukkan perubahan warna dan pada gambar 6 menunjukkan bahwa setelah disemprotkan Lieberman-Burchard untuk senyawa terpenoid tidak pula menunjukkan perubahan warna. Hal ini dikarenakan fase gerak yang digunakan mungkin tidak sesuai, sehingga senyawa tersebut tidak mengalami perubahan. Data hasil penampang bercak KLT dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil Penampang Bercak Kromatografi Lapis Tipis

Senyawa	Deteksi	Hasil positif	Hasil penelitian	Ket	Rf
Flavonoid (polar)	Ammonia	Kuning, hijau, coklat atau hitam kuat	Kuning	+	0,70 (41)
Tanin (polar)	FeCl ₃	Hijau, merah, ungu, biru atau hitam kuat	Hitam	+	0,68 (42)
Alkaloid (semi polar)	Bouchardat	Merah jingga, coklat pekat	Tidak mengalami perubahan	-	0,56
Terpenoid (nonpolar)	Liebermann-Burchard	Merah jingga, atau ungu	Tidak mengalami perubahan	-	0,52

Hasil kromatografi lapis tipis menunjukkan hasil positif mengandung flavonoid setelah disemprot dengan reagen amoniak yang ditandai dengan terbentuknya warna kuning kecoklatan pada plat. Perubahan warna ini terjadi karena adanya interaksi antara uap amoniak dengan gugus hidroksil pada flavonoid [21]. Hasil penampang bercak kromatografi lapis tipis menunjukkan hasil positif mengandung senyawa tanin setelah disemprot dengan FeCl₃ yang ditandai dengan terbentuknya warna hitam kuat pada plat, Hasil kromatografi lapis tipis menunjukkan hasil negatif mengandung alkaloid setelah disemprot dengan bouchardat karena tidak terbentuknya warna merah, jingga, coklat pekat pada plat. Hasil kromatografi lapis tipis negatif mengandung terpenoid setelah disemprot dengan Liebermann-Burchard karena tidak terbentuknya warna merah, jingga, atau ungu.

Bercak noda pada fraksi etanol bunga kamboja putih dengan melihat hasil uji semprot amoniak dapat dinyatakan mengandung senyawa flavonoid dengan Rf 0,70. Fraksi etanol bunga kamboja putih dengan melihat hasil uji semprot dapat

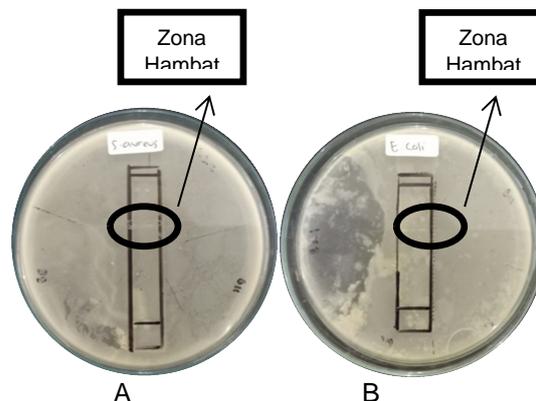
dinyatakan mengandung senyawa tanin dengan Rf 0,68. Hasil uji penampang bercak fraksi etanol bunga kamboja putih menunjukkan bahwa terdapat senyawa flavonoid dan senyawa tanin yang bersifat sebagai antibakteri.

Hasil Uji Bioautografi

Hasil uji aktivitas antibakteri menunjukkan bahwa fraksi etanol bunga kamboja putih memiliki aktivitas antibakteri, sehingga dilanjutkan ke uji bioautografi. Bioautografi merupakan metode untuk mendeteksi bercak pada kromatogram hasil KLT yang memiliki aktivitas antibakteri dengan cara menempelkan plat KLT pada permukaan media agar yang telah ditanami mikroorganisme. Letak senyawa aktif akan tampak sebagai zona bening dengan latar belakang keruh.

Pada penelitian ini digunakan metode bioautografi kontak karena lebih mudah, sederhana dan paling sering digunakan. Keuntungan menggunakan bioautografi kontak dibandingkan dengan bioautografi langsung dan pencelupan yaitu proses perpindahan senyawa aktif ke dalam medium agar yang dapat menghasilkan zona hambat yang lebih besar dan ketersebaran bakteri dapat dijamin serta zona hambat dapat langsung diamati pada media agar. Sedangkan pada bioautografi langsung penyebaran bakteri pada lempeng sering tidak merata dan kemungkinan terjadinya kontaminasi lebih besar, begitu pula halnya dengan bioautografi pencelupan yang zona hambatnya agak sulit diamati.

Hasil bioautografi fraksi etanol bunga kamboja putih yang diuji dengan bakteri *E. coli* dan *S. Aureus*.



Gambar 7. Hasil bioautografi fraksi etanol bunga kamboja putih dengan fase gerak kloroform: metanol : air (2:5:3) (v/v/v) terhadap bakteri (A) *E.coli* dan (B) *S.aureus*

Zona hambat yang terbentuk pada Gambar 4.6 menunjukkan adanya aktivitas antibakteri di kedua cawan dengan harga Rf yang terbentuk yaitu 0,70. Hasil uji KLT bercak pada Rf 0,70 merupakan senyawa flavonoid sehingga senyawa aktif yang paling berperan sebagai antibakteri pada bunga kamboja putih adalah senyawa flavonoid. Hal ini dapat disebabkan karena konsentrasi senyawa flavonoid cenderung lebih besar dibandingkan dengan senyawa-senyawa lainnya. Pada penelitian sebelumnya yaitu skrining fitokimia dari bunga kamboja putih menunjukkan bahwa bunga kamboja putih mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, tanin, saponin, dan terpenoid, namun setelah dilakukan pengujian KLT fraksi etanol bunga kamboja putih mengandung senyawa flavonoid dan tanin.

Pengujian secara bioautografi menunjukkan bahwa kandungan kimia yang terdapat dalam fraksi etanol bungakamboja putih yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *E.coli* dan *S.aureus* adalah senyawa flavonoid, terbukti dengan terbentuknya zona bening pada media dengan harga Rf sebesar 0,70 dan memiliki harga Rf yang sama dengan uji KLT pada senyawa flavonoid yang menunjukkan warna hitam kuat setelah disemprot dengan amoniak positif mengandung senyawa flavonoid.

Flavonoid merupakan senyawa pigmen alami yang mempunyai warna kuning hingga tidak berwarna, tidak larut dalam air serta tahan terhadap panas [22]. Flavonoid sering disintesis tanaman dalam responnya terhadap infeksi mikroba. Mekanisme flavonoid dalam antibakteri yaitu dengan membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstrak seluler dan terlarut dengan dinding mikroba. Flavonoid berperan secara langsung dengan mengganggu fungsi sel mikroorganisme dan penghambatan siklus sel mikroba [23].

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

1. Fraksi etanol bunga kamboja putih memiliki aktivitas antibakteri terhadap *E.coli* dan *S.aureus*, sedangkan fraksi kloroform dan fraksi n-heksan tidak memiliki aktivitas antibakteri.
2. Fraksi etanol bunga kamboja putih terbukti mengandung senyawa flavonoid dan tanin namun yang memberikan efek antibakteri adalah senyawa flavonoid dengan harga Rf 0,70

Saran.

Perlu dilakukan isolasi dan identifikasi lebih lanjut mengenai senyawa antibakteri yang terdapat dalam ekstrak maupun fraksi bunga kamboja putih yang mempunyai aktivitas antibakteri.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih Kepada ketua Laboratorium Mikrobiologi Universitas Tulang Bawang, Lampung dan para laboran yang telah banyak membantu menyelesaikan penelitian ini

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Wattimena. 1991. Farmakodinamik dan Terapi Antibiotik. Yogyakarta: Gajah Mada University Press
- [2] Jawetz E., Melnick GE., Adelberg CA. 2001. Mikrobiologi Kedokteran. Penerjemah: Bagian Mikrobiologi Kedokteran Universitas Airlangga. Penerbit Salemba Medika, Surabaya. Edisi 1, Halaman 211-249.
- [3] Depkes RI. 2016. *Profil Kesehatan Indonesia*. Jakarta: Kementrian Kesehatan Republik Indonesia.
- [4] Yasir Y, Yuniati Y, Paramita S, Zubaidah M, Mu'ti A, Danial D. 2017. Analisis Bioautografi Dengan Kromatografi Lapis Tipis Pada Ekstrak Etanol Daun (*Caesalpinia sumatrana* ROXB.) Terhadap Bakteri Penyebab Infeksi Nosokomial. *J Sains dan Kesehatan*. 1(7):359–66.
- [5] Thitilertdecha, N., A. Teerawutgulrag, dan N. Rakariyatham. 2008. Antioxidant and Antibacterial Activities Of *NepheliumLappaceum* L. Extracts. *Food Science and Technology*. 4(1) : 2029-2035
- [6] Yesmin, B. (2016). Study on agarwood (*Aquilaria malaccensis*) to Evaluate Antibacterial and Antioxidant Activities Of N-hexane, Chloroform and Ethyl Acetate Extracts. Bangladesh: Department of Pharmacy, Southeast University, Banani, Dhaka
- [7] Sari, L.O.R.K, 2006, Pemanfaatan Obat Tradisional dengan Pertimbangan Manfaat dan Keamanannya, Majalah Ilmu Kefarmasian, 3(1 April.01–07) ISSN : 1693-9883.
- [8] Kumari, S., Mazumder, A., Bhattacharya, S., (2012), In-vitro

- Antifungal Activity of The Essential Oil of Flowers of *Plumeria alba* Linn. (Apocynaceae), *International Journal of PharmTech Research*, 4(1):208-212.
- [9] Zaheer, Z., Konale, A. G., Patel, K. A., Subur, K. W., dan Farooqui, M. N., (2010), *Plumeria Rubra* Linn.: An Indian Medicinal Plant, *International Journal of Pharmacy & Therapeutics*, 1(2):116-119.
- [10] Monika Gupta, Rakhi, Nisha Yadav, Saroj, Pinky, Siksha, Manisha, Priyanka, Amit, Rahul, Sumit, and Ankit. (2016). Phytochemical Screening of Leaves of *Plumeria alba* and *Plumeria acuminata*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 8 (5);354-358
- [11] Dawood H. Ramadan. A. Hassan and Shaaban M. Abdel Fattah (2016). Antioxidant Activity Evaluation Of Methanolic Extract And Crude Polysaccharides From *Plumeria Alba* L. Leaves. *International Journal of Advanced Research* 4(5);1688-1701
- [12] Mustanir Yahya, Hindiah M. H., Murniana (2014). Antibacterial Activities of Ethyl Acetate Extract From *Plumeria alba* Stem Bark. Syiah Kuala University, Faculty of science, Departemen of Chemistry Darussalam Banda Aceh, Indonesia. 15 (2):107-112
- [13] Dian Riana Ningsih, Zufahair, Purwati. 2014 Antibacterial Activity Cambodia Leaf Extract (*Plumeria alba* L) to *Staphylococcus aureus* and Identification Of Bioactive Compound Group Of Cambodia Leaf Extract 9(2). November, 101-109
- [14] Muhammad Ali Husni, Murniana, Hira Helwati, dan Nuraini. 2013 Antimicrobial Activity Of n-Hexane Extracts Of Red Frangipani. *Jurnal natural* 13(1). Maret.
- [15] Prihardini, Ida kristianingsih. 2016 Uji Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri dan Ekstrak Etanol Bunga Kamboja Putih (*Plumeria acuminata* L) Terhadap *Escherichia coli*. Prosiding Seminar Nasional Tumbuhan Obat Indonesia. Samarinda 20-21 April.
- [16] Ningsih D.R Zufahair. Kartika D. Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Serta Uji Aktivitas Ekstrak Daun Sirsak Sebagai Antibakteri. Purwokerto Jurusan Kimia FMIPA Univ Jendral Soedirman. 2016;104
- [17] Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Farmakope Indonesia. 4th.ed. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia; 1995
- [18] Alvira Widjaya RR. 2012. Uji Antifertilitas Ekstrak Etanol 70% Biji Delima (*Punica granatum* L). Pada Tikus Jantan Strain Sprague-Dawley Secara In Vivo (Skripsi). Jakarta. *Jurnal Kedokteran* 6(2):67-80.
- [19] Dita Widia Ningrum, Dewi Kusri, Enny Fachriyah. 2017. Uji Aktivitas Antioksidan Senyawa Flavonoid dari Ekstrak Etanol Daun Johar (*Senna siamea* Lamk). Semarang, *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi* 20 (3):123-129
- [20] Fatma Kumalasari, 2014. Aktivitas Antibakteri Fraksi Polar, Semipolar, dan Nonpolar Ekstrak Etanol Daun Buni (*Antidesma bunius* (L.) Spreng) Terhadap *Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa* Sensitif Serta Bioautografinya. (Skripsi). Surakarta Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- [21] Markham KR. 1988 Cara Mengidentifikasi Flavonoid. 3rd ed. Bandung: Institut Teknologi Bandung.
- [22] Septiani, Eko Nurcahya Dewi, Ima Wijayanti. 2017. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Lamun (*Cymodocea rotundata*) Terhadap Bakteri

S.aureus dan *E.coli*. Universitas
Diponegoro. Semarang.

- [23] Retnowati, Y., Bialangi, N., Posangi,
N.W. 2011 Pertumbuhan Bakteri
S.aureus Pada Media Yang Di
Ekspos Dengan Infus Daun
Sambiloto (*Andrographis paniculata*),
FMIPA. Universitas Negeri
Gorontalo. 6 (2) : 7-8.