

**PENGARUH POSISI DAUN PADA TANAMAN KEDONDONG
(*Spondias pinnata* (L.f) Kurz) TERHADAP KOMPOSISI
KANDUNGAN KIMIA DAN AKTIVITAS ANTIBAKTERI
SECARA IN VITRO**

*EFFECT OF LEAF POSITION ON KEDONDONG PLANT
(*Spondias pinnata* (L.f) Kurz) ON COMPOSITION OF
CHEMICAL CONTENT AND ANTIBACTERY ACTIVITY
IN VITRO*

HASMA



**SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR**

2018

**PENGARUH POSISI DAUN PADA TANAMAN KEDONDONG
(*Spondias pinnata* (L.f) Kurz) TERHADAP KOMPOSISI
KANDUNGAN KIMIA DAN AKTIVITAS ANTIBAKTERI
SECARA IN VITRO**

Tesis

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar Magister

Program Studi

Ilmu Farmasi

Disusun dan diajukan oleh

HASMA

Kepada

**SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR**

2018

TESIS

**PENGARUH POSISI DAUN PADA TANAMAN KEDONDONG
(*Spondias pinnata* (L.f) Kurz) TERHADAP KOMPOSISI
KANDUNGAN KIMIA DAN AKTIVITAS ANTIBAKTERI
SECARA IN VITRO**

Disusun dan diajukan oleh

HASMA

Nomor Pokok P2501216003

telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Tesis
pada tanggal 16 Agustus 2018
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui
Komisi Penasihat,



Subehan, M.Pharm. Sc., Ph.D., Apt

Ketua



Dr. Sartini, M.Si., Apt.

Anggota

Ketua Program Studi
Magister Ilmu Farmasi,



Dr. Latifah Rahman, DESS., Apt.

Dekan Fakultas Farmasi
Universitas Hasanuddin,



Prof. Dr. Gemini Alam, M.Si., Apt.

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertanda tangan di bawah ini

Nama : HASMA
Nomor mahasiswa : P2501216003
Program Studi : Magister Farmasi

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa tesis yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan tesis ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, Agustus 2018

Yang menyatakan,



HASMA

PRAKATA

Alhamdulillah, puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT, atas limpahan rahmat dan hidayahnya, yang telah memberikan kesehatan dan kemudahannya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis penelitian ini.

Penulis menyadari bahwa banyak kesulitan dan kendala yang dihadapi dalam penelitian tesis ini. Namun semua itu dapat dilalui dengan berkat doa dan bantuan serta dukungan dari berbagai pihak, sehingga penelitian dan penyusunan tesis ini dapat diselesaikan. Tak lupa saya mengucapkan syukur dan banyak terima kasih yang setinggi-tingginya kepada bapak Subehan, S.Si., M.Farm. Sc., Ph. D, Apt. dan Ibu Dr.Hj Sartini, M.Si., Apt. selaku komisi penasehat yang telah meluangkan waktunya untuk membagi ilmu, memberikan bimbingan, saran, pikiran, motivasi, tenaga serta ide-ide kepada penulis hingga penelitian tesis ini dapat diselesaikan.

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu demi terselesaikannya penyusunan tesis ini, terima kasih:

1. Bapak Prof. Dr. Gemini Alam, M.Si, Apt, selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin.
2. Ibu Dr. Hj. Latifah Rahman, DESS., Apt, sebagai Ketua Program Studi Magister Farmasi Universitas Hasanuddin

3. Bapak Prof. H. Tadjuddin Naid, M.Sc., Apt., Ibu Dr. Mufidah, M.Si., Apt., dan Ibu Dr. Herlina Rante, M.Si., Apt. Selaku Komisi Penguji atas saran dan masukan yang diberikan.
4. Bapak/Ibu Dosen beserta seluruh Staf Pegawai Program Studi Farmasi Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin
5. Bapak/Ibu Dosen beserta Staf Stikes Nani Hasanuddin Makassar
6. Teman-teman Magister Farmasi Angkatan 2016 Program Studi Farmasi Pascasarjana Universitas Hasanudin yang senantiasa memberi motivasi hingga terselesainya penelitian ini.
7. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu, semoga Allah SWT melimpahkan rahmatnya dengan pahala yang melimpah atas kebaikannya. Amin.

Tak lupa saya ucapkan banyak terima kasih kepada kedua orang tua saya, ayahanda Alm. H. Bakkareng Dg. Makkati dan ibu Hj. Becce yang telah memberikan pengorbanan yang besar baik moril maupun moral yang tidak dapat penulis untuk membalasnya. Penulis juga mengucapkan banyak-banyak terima kasih kepada suami tercinta Awaluddin, ST. Ananda Aqilah Humairo Azzah yang telah memberikan semangat dan motivasi, serta pengorbanan yang besar sehingga penyusunan tesis dapat terselesaikan. Kepada saudara-saudaraku tercinta Harisa, Syaharuddin, Firdaus, Hasanah, Hasni, Harmisaid B, Hasruddin B dan Wahyuddin serta seluruh keluarga besarku terima kasih sebesar-besarnya atas doa dan dukungan yang telah diberikan.

Penulis menyadari tesis ini masih jauh dari kesempurnaan, maka sangat mengharapkan saran dan kritik demi kesempurnaan karya ini. Akhir kata semoga karya ini dapat bermamfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan kedepannya terutama dalam bidang farmasi. Amin.

Makassar, Agustus 2018



Hasma

ABSTRAK

HASMA. Pengaruh Posisi Daun Pada Tanaman Kedondong (*Spondias pinnata* (L.f) Kurz) Terhadap Komposisi Kandungan Kimia Dan Aktivitas Antibakteri Secara In Vitro. (dibimbing oleh Subehan dan Sartini).

Daun kedondong adalah salah satu tanaman yang berpotensi dijadikan sebagai bahan baku antibakteri. Penelitian ini bertujuan: (1) mengetahui pengaruh letak posisi daun terhadap komposisi kandungan kimia, (2) aktivitas antibakteri, dan (3) mengetahui fraksi dari ekstrak etanol daun kedondong yang memiliki aktivitas antibakteri terbaik. Sebanyak 200 g masing-masing simplisia daun kedondong (pucuk, tengah dan pangkal) dimaserasi menggunakan etanol 70% dengan perbandingan 1:7 dilanjutkan dengan pengujian aktivitas antibakteri, partisi terhadap ekstrak aktif yang memberikan aktivitas antibakteri dan dilanjutkan dengan perbandingan profil kromatogram dengan UFLC. Aktivitas antibakteri diuji dengan metode difusi agar berlapis menggunakan medium MHA (Muller Hinton Agar) waktu inkubasi 1x24 jam suhu 37°C terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Kontrol negatif DMSO (Dimethylsulfoxida) dan kontrol positif amoxicillin. Hasil penelitian menunjukkan ekstrak etanol daun kedondong (pucuk, tengah dan pangkal) mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, tanin dan saponin. Aktivitas antibakteri *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* yaitu pucuk dengan zona hambat sebesar 14,30 mm dan 14,43 mm. Fraksi yang memiliki aktivitas antibakteri yaitu fraksi n-heksan dan etil asetat dengan zona hambat sebesar 13,27 mm dan 12,91 mm, dan fraksi etil asetat sebesar 12,49 mm dan 12,41 mm. Berdasarkan analisis profil kromatogram dari masing-masing ekstrak dengan UFLC pada panjang gelombang 254 dan 366 menunjukkan pengaruh terhadap komponen kandungan kimia dilihat dari tinggi puncak dan luas area, dilihat dengan adanya sinyal-sinyal yang ada pada masing-masing kromatogram.

Kata Kunci: *Spondias pinnata* (L.f) Kurz, aktivitas antibakteri, *Staphylooccus aureus* , *Pseudomonas aeruginosa*, UFLC.

ABSTRACT

HASMA. Effect of Leaf Position on Kedondong Plant (*Spondias pinnata* (L.f) Kurz) on In Vitro Composition of Chemical Content and Antibacterial Activity. (Supervised by **Subehan** and **Sartini**).

Kedondong leaves are one of the plants that have the potential to be used as antibacterial raw material. This study aims to: (1) determine the effect of the position of the leaves on the composition of the chemical content, (2) antibacterial activity, and (3) find out the fraction of the ethanol extract of kedondong leaves which has the best antibacterial activity. A total of 200 g of each simplicia of kedondong leaves (shoots, middle and base) were macerated using 70% ethanol with a ratio of 1: 7 followed by testing for antibacterial activity, partitioning the active extracts which provided antibacterial activity and continued by comparison of chromatogram profiles with UFLC. Antibacterial activity was tested by a diffusion method using a medium MHA (Muller Hinton Agar) incubation time of 1x24 hours at 37⁰C against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* bacteria. Negative control in the form of DMSO (Dimethylsulfoxida) and positive control of amoxicillin. The results showed that ethanol extract of kedondong leaves (shoots, middle and base) contained flavonoids, alkaloids, tannins and saponins. Antibacterial activity of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* namely shoots with inhibition zones of 14.30 mm and 14.43 mm. The fractions that had antibacterial activity were n-hexane and ethyl acetate fraction with inhibition zones of 13.27 mm and 12.91 mm, and ethyl acetate fractions of 12.49 mm and 12.41 mm. Based on the chromatogram profile analysis of each extract with UFLC at wavelength 254 and 366 shows the effect on the chemical component seen from the peak height and area, seen by the signals in each chromatogram.

Keywords: *Spondias pinnata* (L.f) Kurz, antibacterial activity, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, UFLC.

DAFTAR ISI

	Halaman
PRAKATA	v
ABSTRAK	viii
ABSTRAC	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
DAFTAR SINGKATAN	xvii
I. PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	4
C. Tujuan Penelitian	4
D. Manfaat Penelitian	5
II. TINJAUAN PUSTAKA	
A. Uraian Tanaman	6
B. Uraian Mikroba Uji	9
C. Metode Ekstraksi	12
D. Uraian Antimikroba	15
E. Metode Kromatografi Lapis Tipis	18
F. Partisi Ekstrak	27
G. Kerangka Teori	29

H. Kerangka Konsep	30
I. Defenisi Operasional	31
III. METODE PENELITIAN	
A. Rancangan Penelitian	32
B. Waktu dan Lokasi Penelitian	32
C. Alat dan Bahan	32
D. Metode Kerja	33
E. Pengumpulan dan Analisis Data	39
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	
A. Hasil	41
B. Pembahasan	41
V. PENUTUP	
A. Kesimpulan	66
B. Saran	66
DAFTAR PUSTAKA	67

DAFTAR TABEL

nomor	halaman
1. Hasil ekstraksi daun kedondong (pucuk, tengah dan pangkal) dengan cairan penyari etanol 70%	41
2. Hasil skrining fitokimia ekstrak etanol daun kedondong	42
3. Hasil perbandingan waktu retensi dan luas area ekstrak etanol (pucuk, tengah dan pangkal) dengan UFLC panjang gelombang 254 nm	44
4. Hasil perbandingan waktu retensi dan luas area ekstrak etanol (pucuk, tengah dan pangkal) dengan UFLC panjang gelombang 366 nm	47
5. Hasil pengujian diameter zona hambat ekstrak etanol daun kedondong pada posisi daun (pucuk, tengah, pangkal) terhadap bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	51
6. Hasil pengujian diameter zona hambat ekstrak etanol daun kedondong pada posisi daun (pucuk, tengah, pangkal) terhadap bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	51
7. Hasil rendamen partisi ekstrak cair-cair pucuk daun kedondong	53
8. Perbandingan waktu retensi dan luas area pada fraksi n-heksan, kloroform, etil asetat dan air, panjang gelombang 254 nm	54
9. Perbandingan waktu retensi dan luas area pada fraksi n-heksan, kloroform, etil asetat dan air, pada panjang gelombang 366 nm	58
10. Hasil uji daya hambat ekstrak etanol daun kedondong pada masing-masing fraksi terhadap penghambatan pertumbuhan bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	60
11. Hasil uji daya hambat ekstrak etanol daun kedondong pada masing-masing fraksi terhadap penghambatan pertumbuhan bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	60
12. Hasil perhitungan nilai Rf pada fraksi n-heksan	62

13. Hasil perhitungan nilai Rf pada fraksi etil asetat

63

DAFTAR GAMBAR

nomor	Halaman
1. Tanaman kedondong	7
2. Skema aliran sampel KCKT	23
3. Profil kromatogram ekstrak etanol daun kedondong (pucuk, tengah dan pangkal pada panjang 254 nm	43
4. Profil kromatogram ekstrak etanol daun kedondong (pucuk, tengah dan pangkal) Pada Panjang Gelombang 366 nm	47
5. Profil kromatogram fraksi (n-heksan, etil asetat, kloroform dan air) pada panjang gelombang 254 nm	54
6. Profil kromatogram fraksi(n-heksan, etil asetat, kloroform dan air) pada panjang gelombang 366 nm	57
7. Hasil KLT Fraksi n- hexan, Fase diam GF254 dengan fase gerak etil asetat: n-hexan (3:1)	62
8. Hasil KLT fraksi etil asetat, Fase diam GF254 dengan fase gerak Etil asetat:n-hexan (3:1)	62
9. Pengujian KLT bioautografi bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	63
10. Pengujian KLT bioautografi bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	64
11. Foto hasil aktivitas antibakteri <i>Staphylococcus aureus</i> ekstrak etanol daun kedondong (pucuk, tengah dan pangkal)	79
12. Foto hasil aktivitas Antibakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ekstrak etanol daun kedondong (pucuk, tengah dan pangkal)	80
13. Foto hasil aktivitas antibakteri <i>Staphylococcus aureus</i> fraksi ekstrak etanol pucuk daun kedondong	81
14. Foto hasil aktivitas antibakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i> fraksi ekstrak etanol pucuk daun kedondong	82
15. Hasil profil kromatogram ekstrak etanol pucuk, tengah pangkal daun kedondong panjang gelombang 254 nm	83

16. Hasil profil kromatogram ekstrak etanol pucuk, tengah pangkal daun Kedondong (<i>Spondias pinnata</i> (Lf). Kurz pada panjang gelombang 366 nm.	86
17. Hasil profil kromatogram fraksi ekstrak etanol pucuk daun kedondong (<i>Spondias pinnata</i> (Lf). Kurz) pada UFLC dengan panjang gelombang 254 nm	89
18. Hasil profil kromatogram fraksi ekstrak etanol pucuk daun kedondong (<i>Spondias pinnata</i> (Lf). Kurz) Pada UFLC dengan panjang gelombang 366 nm	93
19. Gambar Alat-alat penelitian	97

DAFTAR LAMPIRAN

nomor	Halaman
1. Skema kerja penelitian	72
2. Skema kerja pembuatan ekstrak daun kedondong	73
3. Skema kerja pengujian UFLC	74
4. Skema kerja pengujian aktivitas antibakteri	75
5. Skema kerja partisi ekstrak	76
6. Skema kerja pengujian KLT Bioautografi	77
7. Komposisi Medium	78
8. Hasil aktivitas antibakteri pada daun kedondong (pucuk, tengah dan pangkal)	79
9. Hasil profil kromatogram pada daun kedondong (pucuk, tengah dan pangkal) pada UFLC dengan panjang gelombang 254 nm	83
10. Hasil profil kromatogram pada daun kedondong (pucuk, tengah dan pangkal) pada UFLC dengan panjang gelombang 366 nm	86
11. Hasil profil kromatogram fraksi ekstrak etanol pucuk daun kedondong pada UFLC dengan panjang gelombang 254	89
12. Hasil profil kromatogram fraksi ekstrak etanol pucuk daun kedondong pada UFLC dengan panjang gelombang 366 nm	93
13. Alat-alat penelitian	97

DAFTAR SINGKATAN

Singkatan	Keterangan
DMSO	<i>Dimetil Sulfoksida</i>
KLT	<i>Kromatografi Lapis Tipis</i>
UV-Vis	<i>Ultra –Violet- Visibel</i>
MHA	<i>Muller Hinton Agar</i>
NA	<i>Nutrien Agar</i>
HPLC	<i>High-performance liquid chromatograph</i>
UFLC	<i>Ultra fast liquid chromatography</i>
KCKT	<i>Kromatografi Cair Kinerja Tinggi</i>
Rf	<i>Faktor Retensi</i>

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Di Indonesia, penggunaan bahan alam sebagai obat tradisional berkembang pesat terutama dalam bidang kesehatan. Penelitian tentang bahan alam sudah banyak diteliti, disebabkan karena senyawa bioaktif pada tanaman juga dapat berkhasiat sebagai antibakteri. Menurut Cowan (1999), dengan adanya metabolit sekunder yang ada pada tanaman seperti tanin, terpenoid, alkaloid, flavonoid, dapat ditemukan secara *in vitro* memiliki sifat antimikroba.

Pencarian antimikroba dari tanaman sampai saat ini masih terus dilakukan karena banyaknya obat-obat antibiotika yang mengalami resistensi (Gelbant *et al.*, 2015). Resistensi patogen pada manusia adalah masalah yang sulit diatasi, sehingga memunculkan kembali ketertarikan pada produk herbal (Oyama *et al.*, 2016). Salah satu cara yang dapat dilakukan adalah dengan pencarian obat-obat antibakteri yang ada pada tanaman (Lewis, 2013).

Salah satu tanaman yang berpotensi memiliki sifat antibakteri adalah kedondong, familia Anacardiaceae. Dari beberapa penelitian diketahui bahwa ekstrak daun *Spondias pinnata* mengandung saponin, flavonoid, glikosida, alkaloid, karbohidrat, steroid yang memiliki aktivitas

antibakteri (Das *et al.*, 2011). Profil kromatografi dari ekstrak n-heksan daun kedondong mengandung terpenoid dan flavonoid (Savitri, 2013). Ekstrak etanol daun *S. pinnata* mengandung terpenoid, flavonoid, tanin, alkaloid, dan saponin (Jain *et al.*, 2014). Ekstrak metanol 70% kulit batang *Spondias pinnata*, mengandung flavonoid dan senyawa fenolik, menunjukkan antioksidan tinggi (Hazra, 2008). Ekstrak metanol dan aquades daun *Spondias pinnata* memiliki aktivitas antidiare (Panda *et al.*, 2012). Selain itu, ekstrak etanol daun *Spondias pinnata* menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* sebesar 24,67 mm, bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yaitu sebesar 21 mm (Jain *et al.*, 2014).

Sejumlah besar bakteri patogen seperti *Staphylococcus aureus*, diketahui bertanggung jawab atas infeksi pada makanan yang menyebabkan risiko terhadap kesehatan manusia. *Pseudomonas aeruginosa* adalah salah satu bakteri yang dapat menyebabkan infeksi nosokomial. Bakteri ini dapat menimbulkan infeksi pada manusia apabila fungsi pertahanan inang abnormal (Mayasari, 2006).

Pada penelitian ini, bakteri yang digunakan adalah bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* karena bakteri tersebut paling umum menyebabkan infeksi luka kronis (DeLeon *et al.*, 2014). *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* diamati pada beberapa model infeksi, termasuk luka dan infeksi paru-paru kronis (Nguyen & Oglesby-Sherrouse, 2016).

Pada penelitian ini, menggunakan pelarut etanol. Keuntungan pelarut etanol 70% yaitu lebih efektif, kapang dan khamir sulit tumbuh, lebih aman, dan tidak berbahaya (Azis *et al.*, 2014). Menurut Jain *et al.*, (2014), analisis fitokimia pada ekstrak daun kedondong dari berbagai pelarut diantaranya heksan, etilasetat, dan etanol. Dari beberapa pelarut, yang positif memiliki kandungan senyawa terbanyak adalah pelarut etanol yaitu flavonoid, tanin, alkaloid, saponin, dan terpenoid, dibandingkan dengan pelarut n-hexan dan etil asetat. Pelarut etanol 70% merupakan pelarut polar, sangat baik digunakan untuk mengekstrak senyawa fenolik (Robinson, 2005). Pelarut polar akan melarutkan senyawa polar dan pelarut nonpolar akan melarutkan senyawa nonpolar (Inayati, 2007).

Jenis dan konsentrasi senyawa kimia pada tanaman sangat mempengaruhi efek farmakologis. Sementara kandungan senyawa kimia dipengaruhi oleh faktor genetik, lingkungan (iklim dan tempat tumbuhnya) dan kondisi (umur dan cara panen) (Setyorini *et al.*, 2016) yang berhubungan erat terhadap komponen pertumbuhan termasuk tinggi tanaman, jumlah cabang, jumlah daun (Hariyani *et al.*, 2015). Selain itu, posisi daun juga berpengaruh terhadap kandungan senyawa bioaktif yang ada didalamnya (Permata & Asben, 2017). Penelitian Balittri (2013), melaporkan bahwa komponen kimia yang ada pada daun teh bervariasi tergantung musim, kondisi tanah dan umur daun. Umur daun yang berbeda akan menghasilkan kualitas dan kadar yang berbeda karena komposisi kandungan kimianya berbeda.

Oleh karena itu belum adanya laporan ilmiah tentang aktivitas antibakteri pada tanaman kedondong (*Spondias pinnata* (L.f) Kurz) berdasarkan posisi daun, maka kami melakukan penelitian tentang pengaruh posisi daun (pucuk, tengah, pangkal) pada tanaman kedondong (*Spondias pinnata* (L.f) Kurz) terhadap komposisi kandungan kimia dan aktivitas antibakteri *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* secara invitro.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan di atas maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Apakah ada pengaruh letak posisi daun kedondong (*Spondias pinnata* (L.f) Kurz) terhadap komposisi kandungan kimianya?
2. Apakah ada pengaruh letak posisi daun kedondong (*Spondias pinnata* (L.f) Kurz) terhadap aktivitas antibakteri?
3. Fraksi manakah dari ekstrak etanol daun kedondong (*Spondias pinnata* (L.f) Kurz) yang memiliki aktivitas antibakteri.

C. Tujuan Penelitian

Adapun tujuan penelitian ini yaitu:

1. Mengetahui pengaruh letak posisi daun kedondong (*Spondias pinnata* (L.f) Kurz) terhadap komposisi kandungan kimia.

2. Mengetahui pengaruh letak posisi daun kedondong (*Spondias pinnata* (L.f) Kurz) yang memiliki perbedaan aktivitas antibakteri.
3. Mengetahui fraksi mana dari ekstrak etanol daun kedondong (*Spondias pinnata* (L.f) Kurz) yang memiliki aktivitas antibakteri

D. Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah memberikan informasi ilmiah tentang pengaruh posisi daun (pucuk, tengah dan pangkal) terhadap aktivitas antibakteri.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Uraian Tanaman

1. Klasifikasi Tanaman

Tanaman Kedondong (*Spondias pinnata* (L.f) Kurz) diklasifikasikan sebagai berikut (Susilo& Dhaniaputri, 2016):

Kingdom	: Plantae
Famili	: Anacardiaceae
Divisi	: Spermatophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Sub divisi	: Angiospermae
Bangsa	: Sapindales
Genus	: <i>Spondias</i>
Jenis	: <i>Spondias pinnata</i> (L.f) Kurz

2. Morfologi tanaman

Di Indonesia *Spondias pinnata* (L.f) Kurz. disebut dengan pohon kedondong. *S. pinnata* merupakan pohon dengan ketinggian \pm 20 m, bentuk daun lonjong, ujung dan pangkal daun meruncing, pertulangan menyirip ganjil, tepi rata, permukaan licin, berwarna hijau, tipe perakaran tunggang, batangnya bulat, berkayu, tumbuh tegak dan permukaannya

halus. Bunganya merupakan bunga majemuk, berbentuk malai dan buahnya merupakan jenis buah buni dan berbentuk lonjong (Susilo & Dhaniaputri, 2016).



Gambar 1: Daun kedondong (*Spondias pinnata* (L.f) Kurz)
(Kavitha *et al.*, 2009)

3. Nama daerah

Di Malaysia dan di Indonesia disebut sebagai kedondong, di Bali dikenal dengan cemcem dan di Filipina dikenal sebagai hevi, di Myanmar dikenal dengan gway, dan di Thailand dikenal dengan makak farang.

4. Kandungan kimia

Minyak atsiri, glikosida, alkaloid, steroid, terpenoid, saponin, tanin dan flavonoid. Daun kedondong mengandung senyawa flavonoid, saponin, alkaloid, dan tanin (Inayati, 2007 ; Harmanto, 2002). Ekstrak *Spondias pinnata* mengandung terpenoid, polifenol dan flavonoid (Dwijaja *et al.*, 2016). Ekstrak metanol 70% kulit *Spondias pinnata*, mengandung sejumlah besar flavonoid dan senyawa fenolik, menunjukkan antioksidan tinggi (Hazra *et al.*, 2008). *Spondias pinnata* mengandung karbohidrat,

alkaloid, glikosida, tanin dan senyawa fenolik dan vitamin C (Bora *et al.*, 2014). Buahnya yang muda mengandung alkaloid, saponin, tanin, flavonoid kandungan fenolik, flavonol, asam galat, asam gallic, asam salisilat, asam chlorogenic, asam ellagic, asam p-coumaric, asam 6-hidroksi- 2, 5, 7, 8 - tetrametilkroma - 2 - karboksilat, kuersetin, katekin, myrecetin dan rutin menunjukkan aktivitas antimikroba tertinggi, dan menunjukkan adanya vitamin E, furfural, fitosterol, campesterol dan asam lemak, volatil menunjukkan isopropyl myristinate sebagai senyawa utama diikuti oleh monoterpenes dan sesquiterpenes lainnya (Satpathy *et al.*, 2011).

5. Kegunaan

Ekstrak etanol daging buah *Spondias pinnata* sebagai sumber potensial antioksidan alami, memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* (Keawsa-ard, 2009). Dapat menghambat pertumbuhan *Escherichia coli* ATCC 8739 dengan penghambatan tertinggi pada konsentrasi 40% ($4,62 \pm 1,0953$ mm) (Hazra *et al.*, 2008), ekstrak metanolnya mampu berpotensi sebagai antituberkulosis terhadap isolat *Mycobacterium tuberculosis* strain *multidrug resistant* (MDR)(Dwijja *et al.*,2013). Ekstrak daun *Spondias pinnata* memiliki aktivitas antibakteri dan antioxidant (Jain *et al.*, 2014).

B. Uraian Mikroba Uji

1. *Staphylococcus aureus*

a. Klasifikasi.

Staphylococcus aureus diklasifikasikan sebagai berikut (Vos, *et al.* 2009):

Kingdom : Bacteria
Filum : Firmicutes
Famili : Staphylococcaceae
Kelas : Bacilli
Ordo : Bacillales
Genus : *Staphylococcus*
Jenis : *Staphylococcus aureus*

b. Morfologi.

Staphylococcus adalah bakteri Gram positif, diameter 0,5-1,5 μm , berbentuk seperti anggur terdiri dari 32 spesies dan 8 sub spesies di genus *Staphylococcus*, yang menyerang tubuh manusia. *Staphylococcus* tidak berspora membentuk fakultatif anaerob tumbuh dengan respirasi aerobik atau dengan fermentasi. Kebutuhan nutrisinya membutuhkan sumber nitrogen organik, sekitar 5 sampai 12 asam amino, yaitu arginin, valin, dan vitamin B, termasuk tiamin dan nikotinamida (Harri *et al.*, 2002).

Staphylococcus aureus berbentuk koloni yang berwarna keemasan jika di medium padat, spesiesnya *aureus*. *Staphylococcus aureus* berdinding sel tebal, antara 20-40 nm. Di bawah dinding sel ada sitoplasma yang tertutup oleh membran sitoplasma. Komponen utama dinding selnya yaitu Peptidoglikan sekitar lebih 50% dari jumlah dinding sel. Peptidoglikan tersebut yang dapat membentuk jaringan dinding sel berlapis-lapis, agar *staphylococci* mampu menahan tekanan osmotik internal yang tinggi. Dinding sel memiliki kelompok polimer yang mengandung fosfat disebut asam teikoat sekitar 40% dari massa dinding sel. Ada dua asam teikoat yaitu *WallTeichoic Acid* (WTA) yang berikatan dengan peptidoglikan melalui ikatan kovalen dan membran sel yang berikatan dengan *lipoteichoic acid* (LTA) yang dimasukkan dalam membran lipid dari bakteri (Harri *et al.*, 2002).

2. *Pseudomonas aeruginosa*

a. Klasifikasi.

Pseudomonas aeruginosa diklasifikasikan sebagai berikut (Sarangi, 2011; Mayasari, 2006).

Kingdom : Bakteri
Filum : Proteobakteri
Family : Pseudomonadaceae
Kelas : Gammaproteobacteria

Genus : *Pseudomonas*

Jenis : *Pseudomonas aeruginosa*

b. Morfologi.

Pseudomonas aeruginosa adalah non-fermentasi, aerobik, berbentuk batang, merupakan bakteri Gram negatif yang biasanya hidup di lingkungan lembab. Terkadang, *Pseudomonas aeruginosa* bisa mengkoloni tubuh manusia, seperti area kulit (dubur), aksila, telinga, mukosa hidung dan tenggorokan serta tinja. Prevalensi kolonisasi *Pseudomonas aeruginosa* pada subyek yang sehat biasanya rendah, tapi tingkat kolonisasi yang lebih tinggi dapat ditemui di rawat inap khususnya di antara subyek yang diobati dengan spektrum luas agen antimikroba. Kolonisasi umum terjadi pada saluran pernapasan dan saluran pencernaan pada pasien yang menerima kemoterapi antikanker, dan pada kulit penderita luka bakar. Juga terdapat di wastafel, pel, larutan desinfektan dan lingkungan lembab lainnya (Rossolini & Mantengoli, 2005).

Pseudomonas aeruginosa termasuk dalam genus *Pseudomonas*, yang ditentukan oleh Migula. *Pseudomonas aeruginosa* merupakan patogen utama bagi manusia, yang dapat menyebabkan infeksi jika fungsi pertahanan inang abnormal. Sehingga disebut patogen oportunistik, yaitu memanfaatkan kerusakan dari mekanisme pertahanan inang untuk memulai suatu infeksi. *Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri

Gram negatif, bersifat aerob, katalase positif, oksidase positif, tidak dapat memfermentasi tetapi dapat mengoksidasi glukosa/karbohidrat lain, tidak berspora, tidak berselubung, mempunyai flagel monotrika sehingga dapat bergerak. Bakteri ini berbentuk batang sekitar $0,6 \times 2 \mu\text{m}$., seperti bakteri tunggal, berpasangan, kadang seperti rantai yang pendek. Dapat tumbuh di air suling dan tumbuh baik karena adanya unsur N dan C. Suhu pertumbuhannya yaitu 42°C , tumbuh di berbagai media pembiakan karena nutrisinya sangat sederhana. Di laboratorium, medium paling sederhana untuk pertumbuhannya digunakan asetat (untuk karbon) dan ammonium sulfat (untuk nitrogen) (Mayasari, 2006).

C. Metode Ekstraksi

1. Pengertian ekstraksi

Ekstraksi atau penyarian adalah proses penarikan zat yang dapat larut dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair. Ekstraksi adalah proses pemindahan massa. Zat aktif yang semula berada dalam sel, ditarik oleh cairan penyari sehingga terjadi larutan zat aktif dalam cairan penyari tersebut (Harborne, 1996).

2. Tujuan ekstraksi

Tujuan dari ekstraksi adalah untuk memisahkan metabolit tumbuhan yang larut. Ekstrak kasar pada metode ini digunakan untuk kandungan

metabolit tumbuhan, seperti alkaloid, glikosida, fenolat, terpenoid dan flavonoid (Azwanida, 2015).

3. Jenis-jenis metode ekstraksi

Proses ekstraksi dapat dilakukan secara panas dan secara dingin. Ekstraksi secara panas yaitu dengan metode refluks, destilasi uap air, sedangkan ekstraksi secara dingin adalah maserasi, perkolasi dan soxhletasi (Harborne, 1996).

a. Maserasi

Maserasi adalah proses perendaman bahan tanaman dalam wadah stopper dengan pelarut yang sesuai pada suhu kamar untuk jangka waktu minimum selama 3 hari. Proses tersebut dimaksudkan untuk melembutkan dan menghancurkan dinding sel tanaman untuk melepaskan zat kimia yang dapat larut. Setelah 3 hari, campuran kemudian dipisahkan dan disaring dengan penyaringan. Di dalam Metode konvensional, panas ditransfer melalui konveksi dan konduksi dan pilihan pelarut akan menentukan jenis senyawa yang diekstraksi dari sampel (Azwanida, 2015).

Maserasi adalah cara untuk menyari simplisia yang mengandung zat aktif yang dapat larut dalam cairan penyari, seperti zat yang dapat mengembang dalam cairan penyari, dan tidak mengandung zat seperti benzoin, stirok. Keuntungan metode maserasi adalah peralatannya

sederhana dan mudah, sedangkan kerugiannya adalah waktu yang digunakan lama, penyariaannya kurang sempurna (Dirjen POM, 1986).

b. Perkolasi

Metode perkolasi adalah metode yang digunakan dengan cara mengalirkan cairan penyari dengan serbuk simplisia yang sudah dibasahi dengan pelarut sebelum dimasukkan kedalam perkolator.

Keuntungan metode perkolasi yaitu banyak digunakan untuk skala industri dan laboratorium. sampel senantiasa dialiri oleh pelarut baru. Sedangkan kerugiannya adalah sampel padat dalam perkolator tidak homogen atau terbatas sehingga pelarut sulit menjangkau seluruh area. Metode ini membutuhkan waktu yang lama, dan membutuhkan biaya yang mahal (Tetti, 2014).

c. Metode Soxletasi

Metode ini dilakukan dengan cara berkesinambungan. Pelarut dipanaskan hingga mendidih. Uap pelarut terkondensasi hingga terbentuk molekul-molekul air oleh pendingin balik dan kembali turun untuk menyari sampel pada klongsong dan kembali masuk kedalam labu alas bulat setelah mencapai sifon, pelarut akan turun kembali dalam labu alas bulat dan terjadi proses sirkulasi. Proses ini terus menerus hingga zat aktif yang diperoleh dapat tersari secara keseluruhan yang ditandai dengan warna yang jernih pada pelarut pada pipa sifon(Dirjen POM, 1986).

Keuntungan dari metode ini sampel yang digunakan yang berstekstur lunak, tidak tahan panas, proses ekstraksi yang kontinyu,

pelarut yang digunakan tidak banyak dan tidak memerlukan waktu yang lama. Kerugiannya adalah zat aktif yang diperoleh mudah rusak karena adanya pemanasan secara terus menerus (Tetti, 2014).

d. Metode destilasi uap air

Metode ini banyak digunakan untuk menyari simplisia yang banyak mengandung zat aktif dan minyak-minyak menguap karena memiliki titik didih yang tinggi. Metode ini adalah senyawa yang bersifat termolabil dapat rusak dengan adanya pemanasan (Tetti, 2014).

e. Metode Refluks

Metode ini merupakan metode secara berkesinambungan. Sampel terlebih dahulu direndam dengan pelarut, kemudian dimasukkan dalam labu alas bulat dan dilakukan proses pemanasan hingga mencapai titik didih. Uap terkondensasi yang akan turun kembali ke dalam labu dan akan menyari kembali sampel yang ada pada labu. Demikian seterusnya hingga penyarian sempurna. Ekstraksi diulangi sebanyak 3 kali dengan waktu 4 jam (Dirjen POM, 1986).

D. Uraian Antimikroba

1. Antimikroba

Antimikroba adalah obat yang digunakan untuk membasmi infeksi mikroba pada manusia. Obat-obat yang digunakan untuk memberantas infeksi tersebut harus bersifat toksisitas selektif. Artinya obat tersebut

bersifat sangat toksis terhadap mikroorganisme penyebab penyakit tetapi tidak relatif tidak toksis terhadap jasad inang (Djide MN, Sartini, 2008).

Sifat antimikroba berdasarkan toksisitasnya terdiri dari: Bakteriostatika dan Bakteriosida. Bakteriostatika merupakan zat atau bahan yang dapat mencegah dan menghambat pertumbuhan bakteri, sehingga dalam keadaan tersebut jumlah mikroorganisme menjadi stasioner, dan dapat lagi multisioner dan berkembang biak. Contohnya: Sulfonamid, Tetrasiklin, Kloramfenikol, Eritromisin, Novobiosin dan Para Amino Salicylic Acid. Sedangkan bakteriosida merupakan zat atau bahan yang dapat membunuh pertumbuhan bakteri, sehingga dalam hal ini bakteri tidak dapat lagi multisioner dan berkembang biak. Sehingga jumlah bakteri akan berkurang seperti Penisilin, Sefalosposrin, Neomisin. Antimikroba tersebut tidak dianjurkan digunakan bersama dengan obat antimikroba bakteriostatika (Djide MN, Sartini, 2008).

2. Aktivitas antibakteri

a. Uji difusi agar.

Metode difusi meliputi tehnik agar-*overlay* seperti cakram, strip, sumur, dan silinder. Uji difusi disk adalah salah satu metode pengujian kerentanan antimikroba yang paling umum digunakan. Di Amerika Serikat metode ini resmi untuk deteksi kualitatif zat penghambat dalam susu. Kertas saring kecil (diameter sekitar 1 cm) diresapi dengan sejumlah standar zat antibakteri ditempatkan pada lempeng agar yang diinokulasi

sebelumnya. Plat dibalik dan diinkubasi. Sebelum diinkubasi, plate dengan disk berada pada suhu mendekati 0°C selama beberapa jam untuk memungkinkan difusi. Waktu inkubasi bervariasi sampai 48 jam (Choma, 2005).

b. Uji dilusi.

Metode ini dapat digunakan untuk mendapatkan konsentrasi (MIC) dari ekstrak dengan cara sampel harus homogen dan terdispersi dalam air. Biasanya dicampur dengan berbagai pengenceran dengan media inokulasi. Setelah diinkubasi, sifat penghambatan sampel dapat diperkirakan dengan perbandingan turbidimetri atau visual dengan biakan kontrol. Pada uji tabung berbagai konsentrasi analit dicampur dengan serangkaian tabung dengan suspensi bakteri. Jumlah terkecil menyebabkan penghambatan pertumbuhan bakteri, media tetap jernih, memberikan nilai MIC. Dalam pengenceran agar dengan berbagai konsentrasi zat antibakteri yang dicampur dengan *nutrient agar*. Plat agar diinokulasi dan diinkubasi. Konsentrasi terendah dari antibiotik yang menunjukkan tidak ada pertumbuhan yang dibaca sebagai nilai MIC. Uji MB dilakukan dalam *microtitre plate*. Setelah inkubasi pertumbuhan bakteri ditunjukkan dengan adanya putih pellet dibagian dasar sumur (Choma, 2005).

E. Metode Kromatografi Lapis Tipis

1. Kromatografi lapis tipis

Kromatografi lapis tipis digunakan sebagai alat untuk menentukan identitas dan kemurnian untuk uji kuantisasi. Secara umum, teknik ini digunakan untuk memantau reaksi kimia. TLC biasanya dilakukan dengan menggunakan kertas atau gelas, aluminium, atau plastik yang tersedia secara komersial yang dilapisi adsorben (pelat KLT). Adsorben yang biasa digunakan untuk pemisahan asam nukleat yaitu selulosa, DEAE-selulosa, PEI-selulosa, silika gel, atau adsorben fase terbalik C_{18} . Silika gel adalah adsorben polar yang biasa digunakan untuk memisahkan senyawa polaritas rendah sampai sedang. Senyawa yang sangat polar akan "menempel" ke kutub adsorben dan dapat dimurnikan menggunakan pelat TLC fase terbalik C_{18} (plate dilapisi dengan adsorben lipofilik). Dalam fase terbalik, senyawa nonpolar akan "menempel" ke adsorben, sehingga memungkinkan untuk memisahkan senyawa sangat polar. KLT dapat digunakan untuk pemisahan uji dalam kromatografi kolom (Meyers, 2008).

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) memiliki kelebihan antara lain dapat menghasilkan pemisahan yang lebih baik, mudah, dan alat yang digunakan lebih sederhana dan memiliki kepekaan yang lebih tinggi (Day dkk, 2002).

Prinsip KLT Mirip dengan metode kromatografi lainnya, kromatografi lapis tipis juga didasarkan pada prinsip pemisahan. Pemisahan tergantung

pada afinitas relatif senyawa terhadap fase diam dan fase gerak. Senyawa-senyawa di bawah pengaruh fase gerak (didorong oleh aksi kapiler) bergerak di atas permukaan fase diam. Selama gerakan ini, senyawa dengan afinitas yang lebih tinggi ke fase diam bergerak perlahan-lahan sementara yang lain berjalan lebih cepat. Hingga, pemisahan komponen dalam campuran tercapai.

2. KLT bioautografi

Bioautografi termasuk dalam metode skrining mikrobiologis umumnya digunakan untuk mendeteksi aktivitas antimikroba. Skrining dapat digunakan sebagai prosedur pertama, yang diterapkan pada sampel yang akan dianalisis. Pada dasarnya, metode ini adalah pengukuran sederhana. Metode skrining memberikan kepekaan yang lebih tinggi dari pada metode lainnya. Metode ini sederhana, murah, menghemat waktu dan tidak memerlukan peralatan canggih. Metode penyaringan bioautografi didasarkan pada aktivitas biologis, seperti antibakteri, antijamur, antitumor, dan antiprotozoa dari zat yang diuji. Metode pendeteksian ini dapat dikombinasikan dengan teknik kromatografi, seperti kromatografi lapis tipis (KLT), kromatografi lapis tipis kinerja tinggi (HPTLC), kromatografi overpressuredlayer (OPLC) dan kromatografi planar elektroda (Chroma & Grzelak, 2011).

3. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT, HPLC) adalah metode khusus kromatografi kolom, umumnya digunakan dalam biokimia dan analisis untuk memisahkan, mengidentifikasi, dan mengukur senyawa aktif (Bansal, 2010).

Kromatografi cair kinerja tinggi (kromatografi cair tekanan tinggi, HPLC) adalah sistem pemisahan dengan kecepatan dan efisiensi yang tinggi, didukung karena kemajuan dalam teknologi kolom, sistem pompa tekanan tinggi, dan detektor yang sangat sensitif dan beragam. KCKT dapat menganalisa berbagai cuplikan secara kualitatif maupun kuantitatif, baik dalam komponen tunggal maupun campuran (Ditjen POM, 1995).

Kegunaan umum KCKT adalah pemisahan sejumlah senyawa organik, anorganik, maupun senyawa biologis, analisis ketidakmurnian (*impurities*) dan analisis senyawa yang tidak mudah menguap (*nonvolatil*). KCKT sering digunakan dalam menetapkan kadar senyawa tertentu seperti asam amino, asam nukleat dan protein dalam cairan fisiologis, menentukan kadar senyawa aktif obat dan sebagainya.

HPLC terutama menggunakan kolom yang menyimpan sampel (fase diam, fase gerak (s) melalui kolom, dan detektor yang menunjukkan waktu retensi molekul. Waktu retensi bervariasi tergantung pada interaksi antara fase diam, molekul yang dianalisis, dan pelarut yang digunakan. Sampel yang akan dianalisis dalam jumlah kecil ke aliran fase gerak dan berinteraksi dengan fase diam. Jumlah tergantung pada sifat analit dan

komposisi fase diam dan fase gerak. Waktu retensi adalah waktu di mana suatu analit elusi tertentu keluar dari akhir kolom. Pelarut yang umumnya digunakan adalah air atau cairan organik seperti metanol dan asetonitril. Elusi Gradien adalah pemisahan yang bertujuan mengubah komposisi fase gerak selama analisis. Gradien yaitu campuran yang memisahkan analit sebagai fungsi afinitas analit untuk fase gerak. Pilihan pelarut, aditif dan gradien tergantung pada sifat fase diam dan analit (Bansal, 2010).

4. Jenis HPLC

Beberapa jenis HPLC yang umumnya digunakan adalah:

a. HPLC fase normal (NP-HPLC),

Metode yang memisahkan analit berdasarkan polaritas. NP-HPLC menggunakan fase diam polar dan fase gerak non-polar. Analit polar berinteraksi dan dipertahankan oleh fase diam polar. Kekuatan adsorpsi meningkat dengan meningkatkan polaritas analit, dan interaksi antara analit polar dan fase diam polar meningkatkan waktu elusi.

b. Fase HPLC terbalik (RP-HPLC atau RPC)

Memiliki fase diam non-polar dan fase gerak air yang cukup polar. RPC beroperasi pada prinsip interaksi hidrofobik, yang dihasilkan dari gaya repulsif antara eluen polar, analit relatif non-polar, dan fase diam non-polar. Pengikatan analit ke fase diam proporsional dengan area permukaan kontak di sekitar segmen non-polar dari molekul analit pada hubungan dengan molekul kecil dalam pelarut air.

c. Kromatografi eksklusi ukuran (SEC)

Metode ini juga disebut kromatografi permeasi gel atau kromatografi filtrasi gel, terutama memisahkan partikel berdasarkan ukuran. Ini juga berguna untuk menentukan struktur tersier dan struktur kuaterner protein dan asam amino. Teknik ini banyak digunakan untuk penentuan berat molekul polisakarida.

d. Kromatografi penukar ion:

Berdasarkan daya tarik antara ion terlarut dan situs bermuatan yang terikat ke fase stasioner. Kecuali ion dengan muatan yang sama. Banyak digunakan dalam memurnikan air, kromatografi pertukaran-ligan, kromatografi pertukaran ion dari protein, kromatografi penukar anion dengan pH tinggi dari karbohidrat dan oligosakarida, dan sebagainya.

e. Kromatografi bio-afinitas:

Pemisahan berdasarkan interaksi protein spesifik dengan molekul protein terikat pada kolom bioafinitas dapat dielusi dalam dua cara:

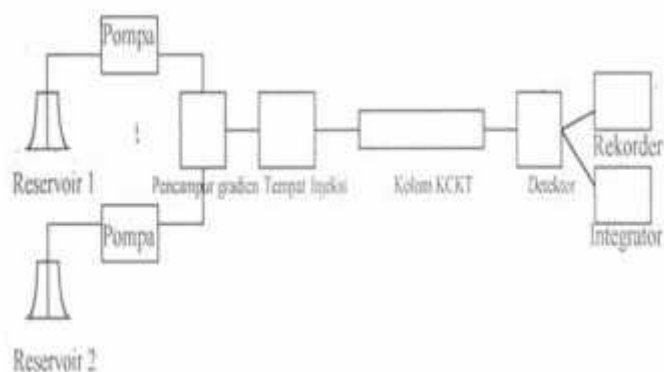
1. Elusi biospesifik: inklusi bebas dalam buffer elusi yang bersaing dengan ligan ikatan kolom.
2. Elusi spesifik: perubahan pH, garam. Karena Yang melemahkan protein interaksi dengan substrat yang terikat kolom spesifisitas interaksi, kromatografi bioaffinity dapat menghasilkan pemurnian yang sangat tinggi (10 - 1000 kali lipat).

4. Kelebihan KCKT

Metode ini mempunyai banyak kelebihan jika dibandingkan dengan metode lainnya. Kelebihan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) antara lain:

- a. Dapat memisahkan molekul-molekul dari suatu campuran
- b. Pelaksanaannya mudah
- c. Kecepatan analisis dan kepekaan yang tinggi
- d. Terhindar dari adanya kerusakan bahan yang akan dianalisis
- e. Resolusi yang baik
- f. Menggunakan berbagai detektor
- g. Kolom dapat digunakan kembali
- h. mudah melakukan "sample recovery"

5. Komponen-komponen KCKT



Gambar 2: Skema aliran sampel KCKT

Komponen KCKT pada dasarnya terdiri :

1. Wadah Fase Gerak

Wadah fase gerak harus bersih dan lemban, dapat menampung 1 sampai 2 liter fase gerak. Sebelum digunakan fase gerak harus degassing untuk menghilangkan gas yang akan berkumpul dengan komponen lain terutama dipompa dan detektor sehingga dapat mengacaukan proses analisis. Pelarut yang digunakan sebagai fase gerak dalam KCKT adalah pelarut, buffer atau reagen yang memiliki kemurnian tinggi atau untuk KCKT yang berderajat KCKT. Fase gerak sebelum digunakan terlebih dahulu dilakukan penyaringan untuk menghindari partikel-partikel kecil, yang dapat mengakibatkan terkumpulnya partikel kecil dalam kolom. Adanya partikel dalam partikel dapat mempengaruhi sistem pada kolom (Gandjar & Rohman, 2009).

2. Fase Gerak KCKT

Fase gerak terdiri dari campuran yang dapat larut, berfungsi dalam daya elusi dan resolusi yang ditentukan dari polaritas dari seluruh pelarut. Fase gerak yang umum digunakan untuk pemisahan dengan fase terbalik adalah campuran air dan asetonitril atau campuran *buffer* dengan metanol. Sedangkan campuran yang digunakan untuk pemisahan dengan fase normal yaitu campuran pelarut dengan hidrokarbon dengan pelarut terklorisasi atau pelarut jenis alkohol. Pemisahan dengan fase tersebut kurang umum dibandingkan dengan fase terbalik (Gandjar & Rohman, 2009).

3. Pompa KCKT

Pompa yang digunakan adalah pompa yang inert. Umumnya bahan yang digunakan pada pompa adalah yang terbuat dari gelas, teflon, batu nilam dan baja tahan karat. Pompa yang digunakan adalah yang bertekanan 5000 psi dan mampu mengalirkan fase gerak dengan kecepatan alir 3 ml/menit. Untuk tujuan preparatif pompa yang digunakan adalah yang memberikan kecepatan aliran 20 ml/menit. Pompa pada KCKT bertujuan menjamin proses penghantaran fase gerak secara tepat, konstan, bebas dari gangguan dan reproduibel. Pompa terdiri dari pompa tekanan konstan dan pompa aliran konstan(Gandjar & Rohman, 2009).

4. Penyuntikan sampel pada KCKT

Sampel cair pada KCKT disuntikkan langsung didalam fase gerak yang mengalir dibawah tekanan menuju kolom dengan menggunakan alat penyuntik yang terbuat dari tembaga yang tahan karat, katup teflon yang dilengkapi dengan keluk sampel internal atau eksternal

5. Kolom

Terdapat dua jenis kolom yang ada pada KCKT diantaranya adalah kolom konvensional dan kolom mikrobor. Keuntungan kolom mikrobor dibanding dengan kolom konvensional yaitu;

- a. Konsumsi fase gerak mikrobor 80 % atau lebih kecil dibanding kolom konvensional. Kecepatan aliran fase gerak pada mikrobor lebih lambat (10/100 ml/menit).

- b. Kolom mikrobor mempunyai aliran fase gerak lambat sehingga lebih ideal apabila dipadukan dengan spektrofotometer massa.
- c. Sensitivitas kolom mikrobor ditingkatkan karena solut lebih pekat, kolom ini dapat berguna apabila volume sampel terbatas. Contohnya sampel klinis.

6. Detektor

Ada 2 macam golongan detektor yaitu detektor universal dan detektor yang spesifik dan selektif. Karakteristik detektor yang ideal adalah:

- a. Mempunyai respon terhadap solute yang cepat dan reproduksibel
- b. Sensitivitas tinggi, mampu mendeteksi solut dengan kadar kecil
- c. Stabil dalam pengoperasiannya.
- d. Sel volume kecil, sehingga dapat meminimalkan pelebaran pita.
Kolom konvensional selnya bervolume 8 ml atau lebih kecil.
Sedangkan kolom mikrobor selnya berukuran 1 ml atau lebih kecil lagi.
- e. Signal berbanding lurus dengan konsentrasi solut pada kisaran yang luas
- f. Tidak peka terhadap perubahan suhu dan kecepatan aliran fase gerak.

Beberapa detektor yang banyak digunakan dalam KCKT antara lain:

1. Detektor Spektrofotometri
2. Detektor Fluoresensi
3. Detektor Indeks Bias

4. Detektor photodiode-array (PDA)
5. Detektor elektrokimia.
7. Integrator atau perekam

Alat-alat yang digunakan untuk pengumpulan data yaitu integrator, komputer, atau dekoder yang terhubung dengan detektor. Alat tersebut berfungsi mengukur sinyal elektronik yang dihasilkan dari detektor lalu memplotkannya sebagai kromatogram.

8. UFLC

Adalah salah satu alat kromatografi cair yang diperkenalkan baru-baru ini. Prinsip Kerjanya hampir sama dengan KCKT, perbedaan pada alat tersebut membutuhkan tekanan tinggi yang dapat memberikan sensitivitas yang tinggi dan pemisahan yang tinggi, UFLC dapat memperkecil penyimpangan hasil dan memperpendek waktu analisis.

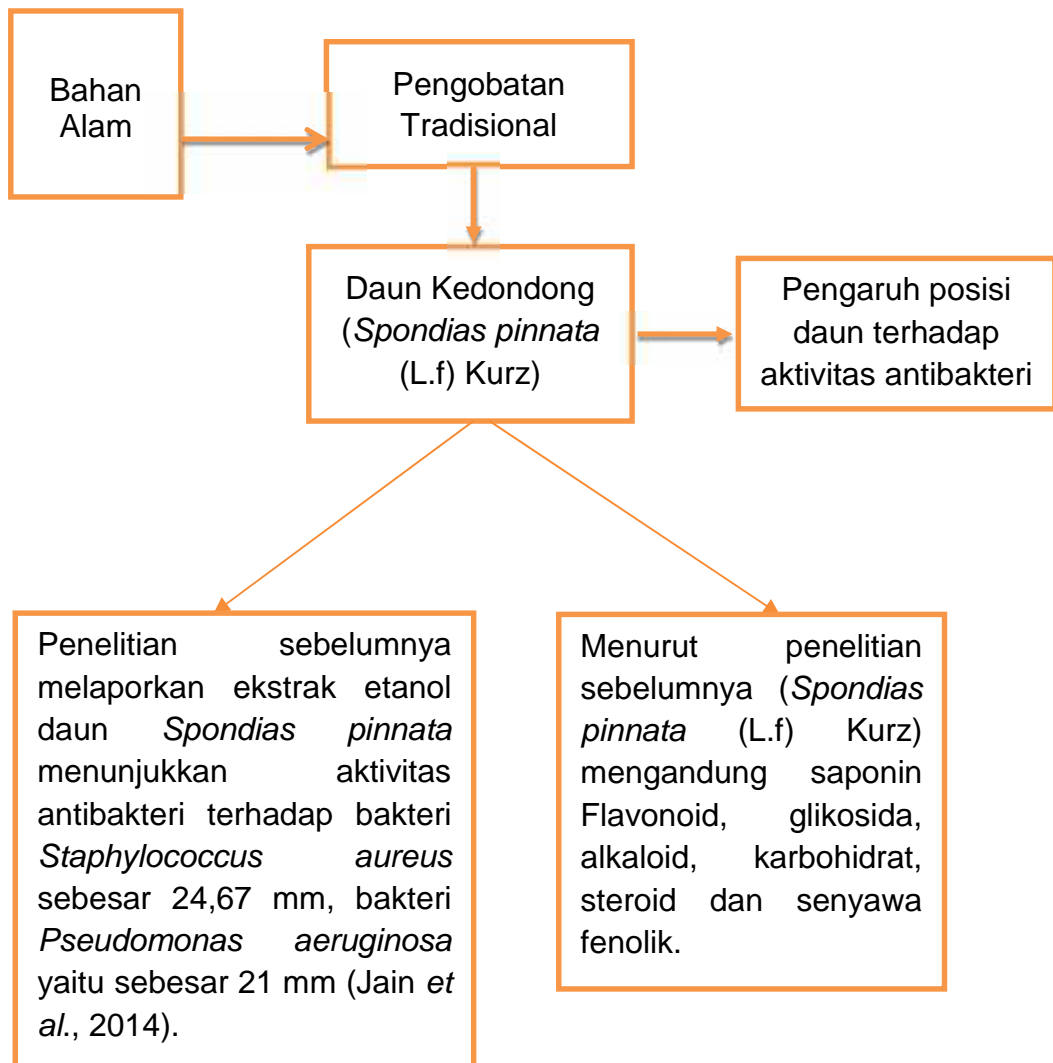
UFLC

F. Partisi Ekstrak

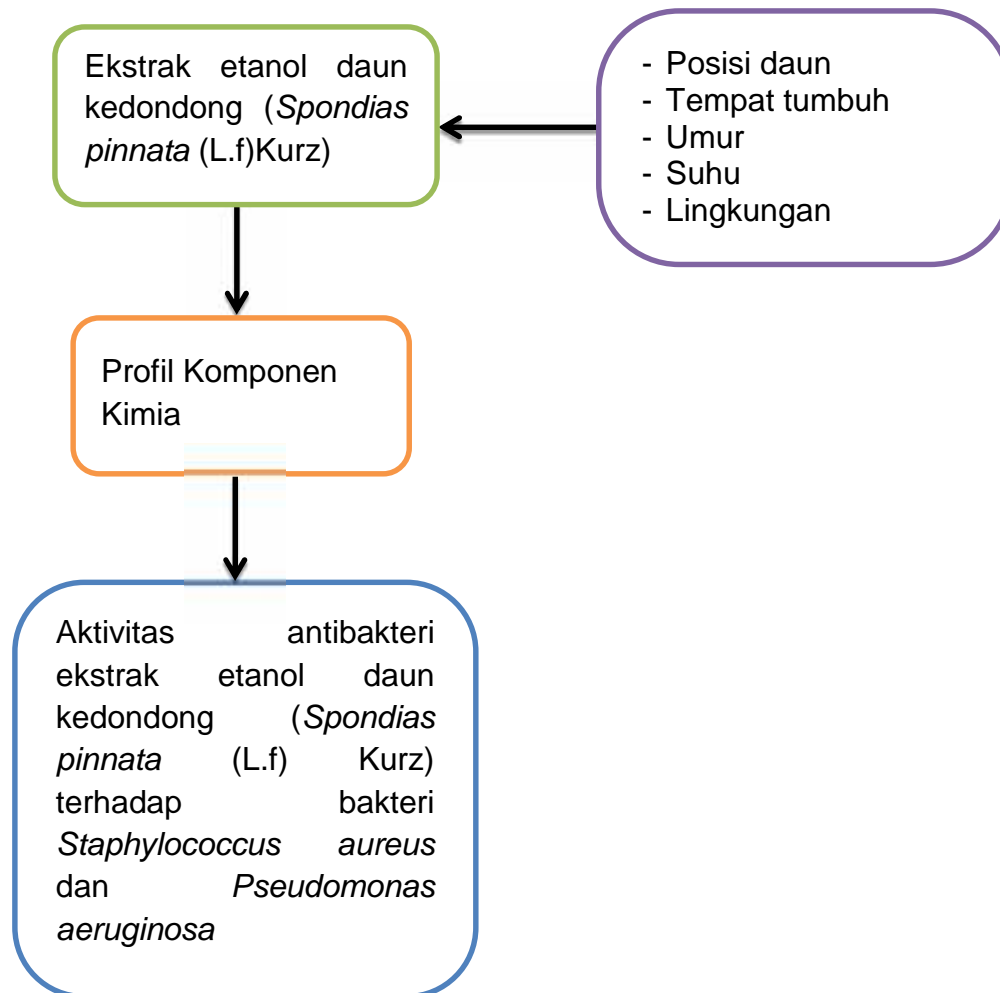
Partisi merupakan proses pemisahan yang mirip dengan ekstraksi pelarut. Dilakukan dengan cara fase diam cair diikatkan pada padatan lapis tipis yang lemban. Dalam partisi yang sebenarnya solute akan terdistribusi diantara fase gerak dan fase diam sesuai dengan kelarutan relatif diantara keduanya (Gandjar & Rohman, 2007). Hukum partisi dapat dirumuskan bila suatu zat terlarut terdistribusi diantara dua pelarut yang tidak saling bercampur, maka pada suatu temperatur yang konstan untuk

setiap spesi molekul terdapat angka banding distribusi yang konstan antara kedua pelarut itu, dan angka banding distribusi ini tidak tergantung pada spesi molekul lain apapun yang mungkin ada. Harga angka banding berubah dengan sifat dasar zat terlarut, sifat dasar pelarut, dan temperatur (Rahman, 2010).

G. Kerangka teori



H. Kerangka konsep



Keterangan:

Variabel Bebas

=

Variabel Kendali

=

Variabel Antara

=

Variabel Tergantung

=

I. Defenisi Operasional

Posisi daun yang digunakan adalah daun pucuk yaitu daun yang masih muda, berwarna hijau muda dengan tekstur yang lunak. Daun tengah adalah daun yang berwarna hijau sedangkan daun pangkal yaitu daun yang berwarna hijau gelap dengan tekstur yang sangat keras.

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental. Penelitian dilakukan dengan beberapa tahap yaitu pengolahan simplisia, ekstraksi, senyawa kimia, uji aktivitas antibakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 170718, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 170830 dan pengolahan data.

B. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Maret - Agustus 2018 bertempat di Laboratorium Biofarmaka Pusat Kegiatan Penelitian (PKP) Universitas Hasanuddin Makassar.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat yang digunakan adalah UFLC Shimadzu LC-20AD, inkubator (*Memmert*), autoklaf (*All American*), BSC II (*Biosafety Cabinet Class II*), Oven (*Memmert*), Lampu UV 366 dan 254 nm, timbangan analitik (*Chiyo JL 200*), lempeng silica gel RPC₁₈, lempeng silica gel GF 254 (*Merck*), lemari pendingin, kompor gas, shaker, tabung reaksi, sonikator, oven, alat-alat gelas, bunsen, cawan petri, cawan porselin,

maserator, rotapavor, pinset, dan vial, jangka sorong (*Tricle Brand*), mikropipet (*Dragonlab*), chamber, pipa kapiler, erlenmeyer, vial, gelas ukur (*Pyrex*), gelas kimia (*Pyrex*), labu tentukur (*Pyrex*), tabung reaksi, bunsen, dan kertas saring.

2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah etanol 70%, aquades, metanol, kloroform, n-hexan, etil asetat, asetonitril, Blank disk amoxicillin (*Oxoid*), DMSO, aluminium foil, kapas, kertas saring, spiritus, medium Nutrien Agar (NA) (Merck), medium Müeller Hinton Agar (MHA) (Merck), mikroba uji *Staphylococcus aureus* ATCC 170718 dan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 170830, sampel daun kedondong (*Spondias pinnata* (L.f) Kurz).

D. Metode Kerja

1. Pengambilan Sampel Tanaman

Daun Kedondong (*Spondias pinnata* (Lf) Kurz) diambil dari daerah Luwu Timur, Provinsi Sulawesi Selatan.

2. Pengolahan Sampel

Sampel yang dikumpulkan, dicuci dengan air mengalir sampai bersih, agar tanaman bersih dan terhindar dari benda asing seperti tanah, pasir dan sebagainya. Kemudian dilakukan pengeringan. Pengeringan

tersebut dilakukan dengan tujuan untuk mengurangi kadar air, untuk mencegah adanya pembusukan oleh bakteri atau jamur. Pembusukan dapat terjadi karena berhentinya proses enzimatik pada jaringan tumbuhan yang selnya sudah mati, agar reaksi enzimatik tidak dapat berlangsung, maka kadar air yang dianjurkan adalah kurang dari 10%. Kemudian sampel yang sudah dikeringkan diblender dan diayak menggunakan ayakan 65 mesh.

3. Pembuatan Ekstrak Daun Kedondong (*Spondias pinnata* (Lf) Kurz)

Masing-masing sampel serbuk simplisia (pucuk, tengah, pangkal) ditimbang sebanyak 200 g dimaserasi dengan menggunakan pelarut etanol sebanyak 1,5 L hingga seluruh simplisia terendam. Maserasi dilakukan selama tiga hari, dan tiap 24 jam ekstrak ditampung dan pelarut diganti dengan pelarut yang sama. Setelah tiga hari, ekstrak dipekatan sehingga diperoleh ekstrak kental dengan bobot tetap. Selanjutnya filtrat dievaporasi sehingga didapatkan ekstrak kental.

4. Penapisan fitokimia (Harborne, 1987)

Penapisan fitokimia dilakukan untuk mengetahui senyawa yang terkandung dalam ekstrak kedondong. Kandungan senyawa yang diperiksa yaitu: golongan flavonoid, alkaloid, saponin, dan tanin.

a. Uji Alkaloid.

0.1 gram sampel ditambah dengan 5 mL kloroform dan 3 tetes ammonia. Fraksi kloroform dipisahkan dan diasamkan dengan 2 tetes

H₂SO₄. Fraksi dibagi menjadi tiga tabung, masing-masing ditambahkan dengan pereaksi Dragendorf, Meyer, dan Wagner. Alkaloid ditandai dengan adanya endapan putih pada pereaksi Meyer, endapan coklat pada pereaksi Wagner dan endapan merah pada pereaksi Dragendorf.

b. Uji Saponin.

0.1 gram sampel ditambah 5 mL aquades dan dipanaskan selama lima menit. Ekstrak kemudian disaring dan filtratnya dikocok. Saponin dapat dilihat dengan timbulnya busa selama \pm 10 menit.

c. Uji Flavonoid.

0.1 gram sampel ditambah dengan methanol hingga terendam lalu dipanaskan. Filtrat ditambahkan dengan H₂SO₄, terbentuknya warna merah menunjukkan adanya senyawa flavonoid.

d. Uji Tanin.

0.1 gram sampel ditambah dengan 5 mL aquades, dididihkan selama beberapa menit. Disaring, kemudian filtratnya ditambah dengan FeCl 1%. Terbentuknya warna biru tua atau hitam kehijauan menandakan adanya tanin.

5. Uji Aktivitas Antibakteri

a. Pembuatan Konsentrasi Ekstrak

Ekstrak kental daun kedondong (*Spondias pinnata* (L.f) Kurz) pada masing- masing posisi daun (pucuk, tengah, pangkal) ditimbang sebanyak

0,1 g. Selanjutnya dilarutkan dengan aquadest steril sebanyak 1 ml, sampai konsentrasi 10% (b/v).

b. Pembuatan Medium Untuk Bakteri

Medium ditimbang sesuai dengan yang ada pada label kemasan, kemudian dilarutkan dengan aquadest dan dipanaskan sampai bahan larut sempurna, Selanjutnya disterilkan dengan menggunakan autoklaf selama ± 15 -20 menit, suhu 121°C .

c. Penyiapan Suspensi Bakteri Uji

Biakan bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 170718 dan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 170830 diinokulasikan kedalam medium Nutrien Agar (NA) miring, diinkubasi pada suhu 37°C selama 1x24 jam. Bakteri yang tumbuh diambil sebanyak 1 ose, dan diinokulasikan kedalam medium Nutrien broth dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1x24 jam. Kemudian dilakukan pengenceran sampai 10^{-1} sampai 10^{-3} . Selanjutnya diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan ketentuan $\text{OD}_{600} = 1$ setara dengan 1×10^8 sel/ml. Pembuatan suspensi biakan *Pseudomonas aeruginosa* dilakukan dengan cara yang sama seperti *Staphylococcus aureus*.

d. Pengujian Aktivitas Antibakteri Dengan Metode Difusi

Aktivitas antibakteri ekstrak ditentukan terhadap bakteri Gram positif *Staphylococcus aureus* dan Gram negative *Pseudomonas*

aeruginosa ditentukan dengan menggunakan metode difusi kertas cakram (Kirby-Bauer) dengan metode agar berlapis. Lapisan pertama “Base Layer” tidak mengandung bakteri uji yang dicampurkan pada media, kemudian dibiarkan memadat. Selanjutnya “Seed Layer” pada lapisan kedua mengandung bakteri uji yang dicampur kedalam media. Dibiarkan kering selama 5 menit. Kertas filter paper disc steril (6 mm diameter) yang mengandung berbagai ekstrak uji (2 mg/disk) kemudian ditempatkan pada permukaan lempeng agar. Plate kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Aktivitas antibakteri dievaluasi dengan mengukur zona penghambatan dalam milimeter. Kertas paper disk yang berisi Amoxicillin digunakan sebagai kontrol positif sedangkan paper disk yang berisi pelarut (DMSO) berfungsi sebagai kontrol negatif.

6. Pengujian Antibakteri dengan metode KLT Bioautografi

a. Pemisahan Senyawa Secara Kromatografi Lapis Tipis

Ekstrak senyawa dipisahkan secara KLT dengan cara ekstrak ditotolkan pada plat KLT menggunakan fase diam selika gel GF-254, kemudian dielusikan dengan fase gerak berupa etil asetat : n-heksan (3:1 v/v). Selanjutnya diamati di bawah lampu UV 254 dan 366 nm.

b. Cara kerja KLT bioautografi

Dilakukan dengan menggunakan metode difusi dengan metode agar berlapis. Dengan cara Lapisan pertama “Base Layer” tidak mengandung bakteri uji yang dicampurkan pada media, kemudian dibiarkan memadat.

Selanjutnya "Seed Layer" pada lapisan kedua mengandung bakteri uji dicampur kedalam media. Lempeng KLT yang sudah dielusikan disimpan diatas permukaan medium agar yang sudah dipadatkan. Setelah 30 menit Lempeng dipisahkan dari medium. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 1x24 jam. Zona hambatan dapat dilihat pada medium agar.

7. Pengujian Dengan Menggunakan UFLC

Ekstrak ditimbang sebanyak 0,01 gram dilarutkan dengan 10 ml metanol pro HPLC dalam labu tentukur 10 ml, kemudian disonikator untuk memperkecil ukuran partikel. Selanjutnya disaring dan sampel dimasukkan kedalam vial autosampler UFLC sebanyak 20 µl. Dianalisis dengan UFLC Shimadzu LC-20 AD dengan kondisi alat:

Kolom	: Shim-Pack Vp-Ods
Sistem	: Fase terbalik
Fase Gerak	: Asetonitril : Metanol : Air = 40 : 20 : 40 (v/v)
Laju Alir	: 1ml/menit
Suhu Kolom	: RT 40°C
Detektor	: Photodiode array (PDA), UV 254 nm dan 366 nm.

8. Pengujian dengan Partisi Ekstrak Pada Ekstrak yang Aktif

Ditimbang sebanyak 10 gram ekstrak etanol daun kedondong (*Spondias pinnata* (Lf) Kurz) dilarutkan dengan aquadest sebanyak 100 ml sampai larut (1:10) Kemudian dimasukkan kedalam corong pisah dan dipartisi cair-cair dengan pelarut n-heksan sebanyak 100 ml, dikocok, lalu

didiamkan hingga memisah. Kedua lapisan pelarut dipisahkan sehingga diperoleh ekstrak larut n-heksan dan ekstrak tidak larut n-heksan. Ekstrak larut n-heksan diuapkan pelarutnya hingga diperoleh ekstrak kering, dilakukan sebanyak 4 kali hingga lapisan heksan berwarna bening. Ekstrak tidak larut n-heksan dimasukkan kembali ke corong pisah dan ditambah pelarut kloroform dengan perbandingan yang sama (1:10) kemudian dikocok, lalu didiamkan hingga memisah. Lapisan bawah fraksi kloroform ditampung dalam cawan porselin, dan diuapkan pelarutnya hingga diperoleh ekstrak kering. Diulangi sebanyak 4 kali hingga lapisan kloroform berwarna bening. Sedangkan lapisan atas ekstrak tidak larut kloroform dipartisi dengan etil asetat dengan perbandingan yang sama (1:10). Dikocok, lalu didiamkan hingga membentuk dua lapisan yaitu fraksi air dan fraksi etil asetat. Diulangi sebanyak 4 kali hingga lapisan etil asetat berwarna bening, fraksi etil asetat di uapkan pelarutnya hingga didapatkan ekstrak kental etil asetat. Fraksi yang didapatkan sebanyak empat fraksi yaitu fraksi n-heksan, fraksi kloroform, fraksi etil asetat dan fraksi air. Fraksi tersebut dilakukan pengujian lebih lanjut dengan uji aktivitas antimikroba, Pengujian dengan HPLC dan pengujian KLT bioautografi pada fraksi yang terpilih.

D. Pengumpulan dan Analisis Data

Data hasil pengujian ekstrak etanol daun kedondong terhadap posisi daun (pucuk, tengah dan pangkal) berdasarkan komposisi kandungan

kimia dan pengujian aktivitas antibakteri *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* selanjutnya dianalisis.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Ekstraksi Daun Kedondong (*Spondias pinnata* (Lf).Kurz)

Daun kedondong (*Spondias pinnata* (Lf).Kurz) masing-masing diekstraksi dengan cairan penyari etanol 70%. Hasil ekstraksi dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil ekstraksi daun kedondong pada posisi daun (pucuk, tengah dan pangkal) dengan cairan penyari etanol 70%.

No.	Daun kedondong (<i>Spondias pinnata</i> (Lf).Kurz)	Berat sampel (g)	Berat Ekstrak (g)	Rendamen Ekstrak (%)
1.	Pucuk	200	43,712	21,856
2.	Tengah	200	54,713	27,356
3.	Pangkal	200	40,126	20,063

Pada Penelitian ini, ekstrak kental yang diperoleh pada masing-masing daun yaitu daun pucuk sebanyak 43,712 g, daun tengah sebanyak 54,713 g dan daun pangkal sebanyak 40,126 g. Rendamen masing-masing ekstrak yaitu daun pucuk 21,856 %, daun tengah 27,356 % dan daun pangkal 20,063%. Berdasarkan hasil rendamen tersebut disebabkan karna adanya tempat tumbuh, perbedaan posisi daun dan perbedaan cairan penyari yang digunakan. Dari penelitian sebelumnya menggunakan beberapa jenis pelarut diantaranya aseton, metanol dan heksan dengan

menggunakan pelarut etanol. Hasil tersebut diperoleh rendemen ekstrak dengan pelarut heksan sebesar 3,57%, pelarut aseton 24,42%, dan pelarut metanol menghasilkan rendemen 37,59% (Inayati, 2007).

B. Identifikasi Kandungan Kimia Ekstrak Etanol Daun Kedondong (*Spondias pinnata* (Lf).Kurz)

Tabel 2. Hasil skrining fitokimia ekstrak etanol daun kedondong

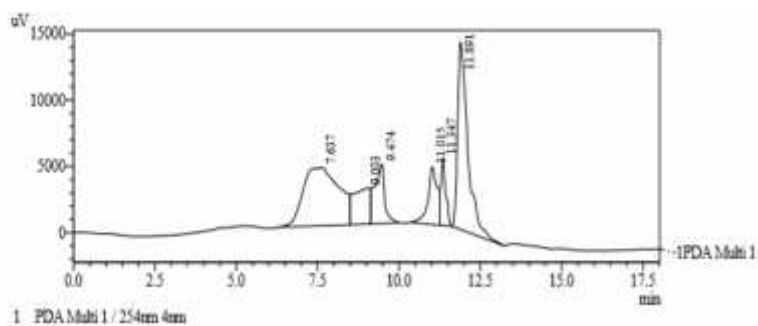
Senyawa	Ekstrak Pucuk	Ekstrak Tengah	Ekstrak Pangkal
Flavanoid	+	+	+
Alkaloid	+	+	+
Tanin	+	+	+
Saponin	+	+	+

Penelitian selanjutnya dilakukan pengujian komponen senyawa kimia diantaranya Flavanoid, alkaloid, tanin dan saponin bertujuan untuk mengetahui komponen kandungan senyawa kimia yang terdapat pada masing-masing ekstrak. Hasil pengujian pada tabel 2 menunjukkan ekstrak etanol daun kedondong pada masing-masing posisi daun (pucuk, tengah dan pangkal) positif mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, tanin dan saponin, dilihat dengan terbentuknya endapan dan warna yang spesifik pada masing-masing senyawa.

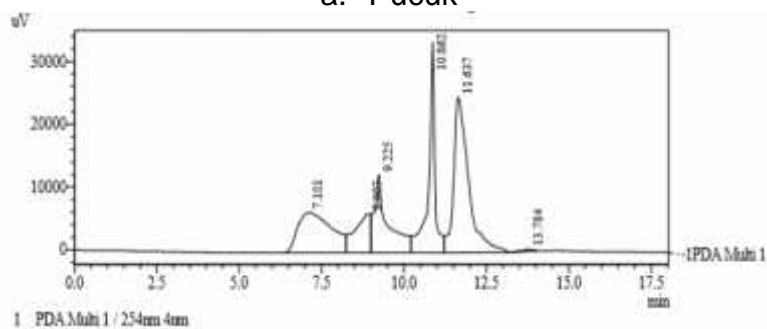
Menurut Inayati, (2007); Harmanto, (2002), daun kedondong mengandung senyawa flavonoid, saponin, alkaloid, dan tanin. Jain *et al.*, (2014) melaporkan analisis fitokimia pada ekstrak daun kedondong yaitu diantaranya pelarut heksan, etil asetat, dan etanol. Dari beberapa pelarut, yang memiliki kandungan senyawa terbanyak adalah pelarut etanol yaitu flavonoid, tanin, alkaloid, saponin, dan terpenoid, dibandingkan dengan

pelarut n-hexan dan etil asetat. Pada pelarut heksan hanya positif mengandung senyawa flavonoid, alkaloid dan terpenoid tanpa adanya senyawa tanin dan saponin, kemudian pada pelarut etil asetat hanya positif mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, tanin dan terpenoid tanpa adanya senyawa saponin.

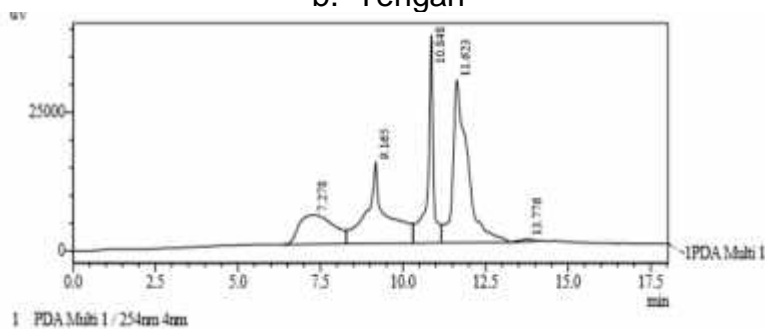
C. Hasil Perbandingan Profil Kromatogram Ekstrak Etanol Daun Kedondong (Pucuk, tengah dan pangkal) Pada Panjang Gelombang 254 nm



a. Pucuk



b. Tengah



b. Pangkal

Gambar 3: Profil kromatogram ekstrak etanol daun kedondong pada panjang gelombang 254 nm (a) pucuk; (b) tengah; (c) pangkal.

Tabel 3: Hasil perbandingan waktu retensi dan luas area ekstrak etanol (pucuk, tengah dan pangkal) dengan UFLC Pada panjang gelombang 254 nm

Waktu Retensi (Menit)	Luas Area		
	Pucuk	Tengah	Pangkal
7,10	-	4565	-
7,27	-	-	386372
7,76	337197	-	-
8,90	-	200780	-
9,00	96307	-	-
9,16	-	-	606633
9,22	-	348918	-
9,47	93667	-	-
10,84	-	441995	-
10,86	-	-	444469
11,01	85906	-	-
11,34	51723	-	-
11,62	-	-	916412
11,63	-	775557	-
11,89	307804	--	-
13,70	-	-	-
13,78	-	8547	-

Berdasarkan analisis profil kromatogram ekstrak etanol daun kedondong (pucuk, tengah, pangkal) dengan menggunakan UFLC pada panjang gelombang 254 menunjukkan waktu retensi dan luas area yang berbeda-beda dari masing-masing ekstrak. Namun dari profil kromatogram tersebut memiliki puncak yang hampir sama pada masing-masing ekstrak. Dapat dilihat pada Gambar 3 dan Tabel 3.

Pada menit ke 7, puncak yang terdapat pada ekstrak pucuk hampir sama dengan puncak yang ada pada ekstrak tengah dan ekstrak pangkal. Diduga komponen senyawa yang ada pada masing-masing ekstrak tersebut memiliki komponen senyawa yang sama. Namun, dari ketiga

ekstrak tersebut dilihat dari profil kromatogramnya yang memiliki komponen senyawa dengan konsentrasi yang tinggi berada pada ekstrak pucuk, disebabkan karena luas area pada ekstrak pucuk lebih besar dibandingkan pada ekstrak tengah dan ekstrak pangkal.

Menit ke-9 dari masing-masing ekstrak memiliki puncak yang hampir sama. Disebabkan karena komponen senyawa yang ada pada ekstrak tersebut sama. Namun, yang memiliki luas area yang besar ada pada bagian pucuk.

Pada menit ke-10. dari ekstrak tengah dan ekstrak pangkal memiliki puncak yang sangat tajam tetapi tidak muncul pada bagian pucuk. Diduga konsentrasi senyawa yang ada pada bagian pucuk lebih rendah dari pada konsentrasi senyawa yang ada pada ekstrak tengah dan ekstrak pangkal. Namun yang memiliki luas area yang besar ada pada ekstrak pucuk.

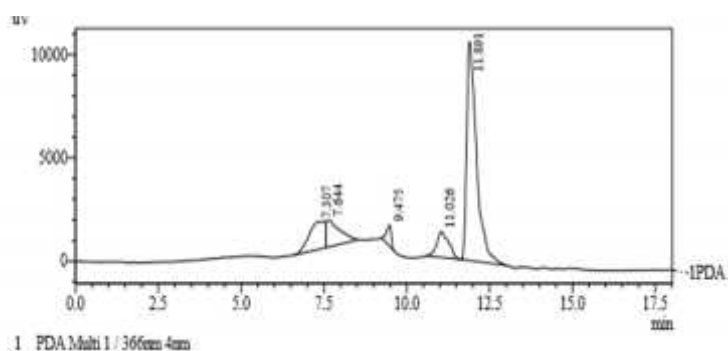
Menit ke-11 dari masing-masing ekstrak diperoleh beberapa puncak yang tajam. Tetapi puncak yang terdapat pada ekstrak pucuk memiliki 3 peak, yang salah satu peaknya jauh lebih tajam dari puncak yang terdapat pada ekstrak tengah dan ekstrak pangkal. Diduga konsentrasi senyawa kimia yang ada pada ekstrak pucuk lebih besar dibandingkan pada ekstrak tengah dan ekstrak pangkal.

Berdasarkan hasil perbandingan profil kromatogram dengan UFLC pada panjang gelombang 254 nm dari masing-masing ekstrak tersebut dapat dilihat, bahwa komponen senyawa yang dimiliki dari masing-masing

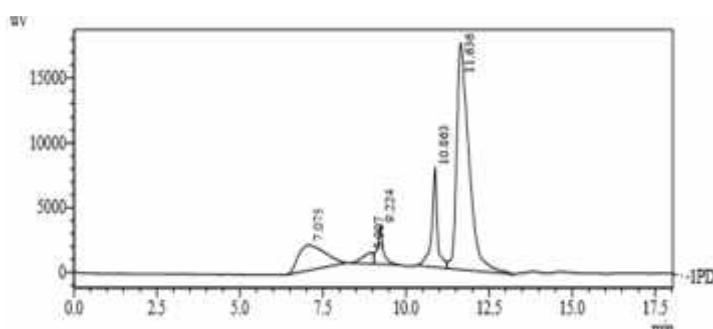
ekstrak berpengaruh pada luas area, terlihat dengan adanya sinyal-sinyal yang ada pada masing-masing kromatogram.

Menurut Rubiyanto, (2016), Puncak yang terdapat pada sampel pada profil kromatogram menunjukkan adanya komponen senyawa yang terdapat dalam masing-masing sampel, sedangkan luas atau tinggi puncak menunjukkan adanya konsentrasi suatu komponen dalam sampel.

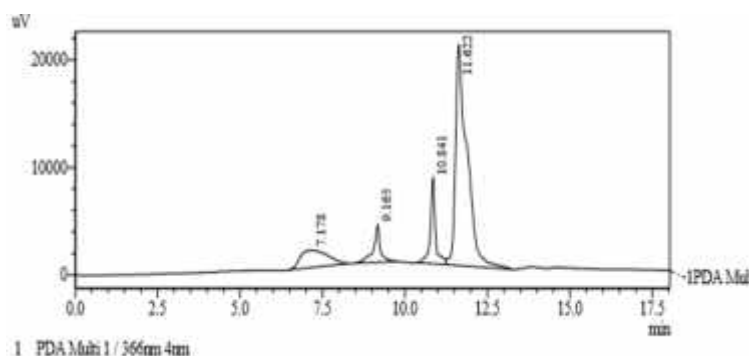
D. Hasil Perbandingan Profil Kromatogram Ekstrak Etanol Daun Kedondong (pucuk, tengah dan pangkal) Pada Panjang Gelombang 366 nm



a) Pucuk



b) Tengah



c) Pangkal

Gambar 4: Profil kromatogram ekstrak etanol daun kedondong pada panjang gelombang 366 nm. (a) pucuk; (b) tengah; (c) pangkal

Tabel 4: Hasil perbandingan waktu retensi dan luas area ekstrak etanol (pucuk, tengah dan pangkal) dengan UFLC pada panjang gelombang 366 nm

Waktu Retensi (Menit)	Luas Area		
	Pucuk	Tengah	Pangkal
7,07	-	106749	-
7,17	-	-	92562
7,30	44856	-	-
7,64	35278	-	-
8,90	-	106749	-
9,16	-	-	51575
9,22	-	34274	-
9,47	10188	-	-
10,84	-	85807	-
10,86	-	-	89935
11,02	31969	-	-
11,62	-	-	503620
11,63	-	44815	-
11,89	217767	-	-

Berdasarkan analisis profil kromatogram ekstrak etanol daun kedondong (pucuk, tengah, pangkal) dengan menggunakan UFLC pada panjang gelombang 366 nm menunjukkan waktu retensi dan luas area

yang berbeda-beda dari masing-masing ekstrak. Namun dari profil kromatogram tersebut memiliki puncak yang hampir sama pada masing-masing ekstrak. Dapat dilihat pada Gambar 4 dan Tabel 4.

Berdasarkan waktu retensi dan profil kromatogram dari masing-masing ekstrak tersebut, yang memiliki luas area yang besar ada pada ekstrak pucuk.

Pada 7 menit dari ekstrak pucuk memiliki puncak yang hampir sama dengan puncak yang ada pada ekstrak tengah dan ekstrak pangkal. Diduga komponen senyawa yang ada pada masing-masing ekstrak memiliki komponen senyawa yang sama. Tetapi ketiga ekstrak tersebut, dilihat dari profil kromatogramnya, yang memiliki luas area yang besar ada pada ekstrak pucuk.

Menit ke-9 dari masing-masing ekstrak memiliki puncak yang hampir sama. Diduga komponen senyawa yang ada pada ekstrak tersebut memiliki komponen senyawa yang sama. Namun luas area yang besar ada pada ekstrak pucuk.

Pada menit ke-10. dari ekstrak tengah dan ekstrak pangkal memiliki puncak yang sangat tajam tetapi tidak muncul pada bagian pucuk. Diduga konsentrasi senyawa yang ada pada bagian pucuk lebih rendah dari pada konsentrasi senyawa yang ada pada ekstrak tengah dan ekstrak pangkal. Namun yang memiliki luas area yang besar ada pada ekstrak pucuk.

Menit ke-11 dari masing-masing ekstrak diperoleh beberapa puncak yang tajam. Diduga komponen senyawa yang ada pada ekstrak

tersebut memiliki komponen senyawa yang sama. Namun dari ketiga ekstrak tersebut bagian pucuk memiliki 2 peak, yang salah satu peaknya memiliki puncak yang sangat tajam dibandingkan pada bagian tengah dan bagian pangkal. Menunjukkan komponen kimia yang terdapat pada ekstrak pucuk memiliki konsentrasi senyawa yang lebih besar dibandingkan pada ekstrak tengah dan ekstrak pangkal.

Berdasarkan hasil perbandingan profil kromatogram dengan UFLC pada panjang gelombang 366 nm dari masing-masing ekstrak tersebut dapat dilihat, bahwa komponen senyawa yang dimiliki dari masing-masing ekstrak berpengaruh pada luas area, terlihat dengan adanya sinyal-sinyal yang ada pada masing-masing kromatogram.

E. Pengujian Aktivitas Antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi kertas cakram dengan metode agar berlapis, menggunakan kontrol negatif (DMSO), kontrol positif (amoxicillin), dan konsentrasi larutan uji 10% (b/v). Penelitian menunjukkan kontrol negatif (DMSO) tidak menghambat pertumbuhan bakteri uji. DMSO merupakan pelarut yang dapat melarutkan senyawa polar dan non polar, baik digunakan karena tidak memberikan pengaruh terhadap bakteri uji. Sehingga kematian bakteri berasal dari larutan uji yang digunakan (Hatijah *et al.*, 2013). Berdasarkan hasil pengukuran daya hambat terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* dari masing-masing ekstrak (pucuk, tengah dan pangkal). Diketahui bahwa dari ketiga ekstrak tersebut dapat menghambat

pertumbuhan kedua bakteri, ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar paper disk.

Pengukuran daya hambat masing-masing ekstrak terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* menunjukkan masing-masing ekstrak memiliki rata-rata daya hambat yang besar yaitu 14,30 mm dan 14,43 mm pada pucuk, kemudian pangkal rata-rata sebesar 10,96 dan 10,03 mm, dan tengah rata-rata sebesar 12,16 dan 10,6 mm. Amoxicillin rata-rata sebesar 14,04 mm dan 14, 04 mm. Hasil tersebut menunjukkan bahwa daun kedondong yang baik digunakan untuk antibakteri adalah berada pada ekstrak pucuk. Dapat dilihat pada tabel 5 dan 6. Hasil aktivitas antibakteri yang tergolong baik kemudian dilanjutkan dengan partisi ekstrak dengan menggunakan pelarut berdasarkan tingkat kepolarannya.

Dari beberapa penelitian diketahui bahwa ekstrak daun *Spondias pinnata* mengandung saponin, flavonoid, glikosida, alkaloid, karbohidrat, steroid yang memiliki aktivitas antibakteri (Das *et al.*, 2011). Besar kecilnya daya hambat masing-masing ekstrak dipengaruhi oleh komponen kimia yang berbeda. Selain itu, ekstrak etanol daun *Spondias pinnata* menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* sebesar 24,67 mm, bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yaitu sebesar 21 mm (Jain *et al.*, 2014).

Tabel 5. Hasil pengujian diameter zona hambat ekstrak etanol daun kedondong pada posisi daun (pucuk, tengah, pangkal) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* (Replikasi 3x)

Perlakuan	Diameter Zona Hambat (mm)			Rata-rata (mm)
	Replikasi I	Replikasi II	Replikasi III	
Ekstrak Pucuk	14 mm	14,5	14,41	14,30
Ekstrak Tengah	13,5	11	12	12,16
Ekstrak Pangkal	12,2	10,7	10	10,96
Amoxicillin	15,5	12,8	13,83	14,04

Tabel 6. Hasil pengujian diameter zona hambat ekstrak etanol daun kedondong pada posisi daun (pucuk, tengah, pangkal) terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* (Replikasi 3x)

Perlakuan	Diameter Zona Hambat (mm)			Rata-rata (mm)
	Replikasi I	Replikasi II	Replikasi III	
Ekstrak Pucuk	14,4	14	14,9	14,43
Ekstrak Tengah	11	10	10,8	10,6
Ekstrak Pangkal	9,8	11,3	9	10,03
Amoxicillin	14,3	14,8	14,1	14,4

F. Partisi Ekstrak Pada Ekstrak yang Aktif

Pada penelitian selanjutnya dilakukan partisi ekstrak secara ekstraksi cair-cair (ECC) dengan corong pisah terhadap ekstrak yang terpilih yang memiliki zona hambatan terbesar dengan menggunakan 4 pelarut yang berbeda kepolarannya yaitu n-heksan (non polar), kloroform (non polar), etil asetat (semi polar) dan air (polar). Proses partisi berfungsi untuk menyederhanakan komponen senyawa dalam ekstrak sehingga

pada proses penyederhaan tersebut komponen senyawa aktif yang ada dalam ekstrak akan terpisah berdasarkan kepolarannya. Menurut penelitian, pelarut n-heksan bersifat non polar dapat mengekstrak senyawa metabolit sekunder seperti sterol, lemak, kumarin dan berbagai senyawa terpenoid. Sedangkan pada pelarut etil asetat bersifat semi polar digunakan untuk mengekstrak senyawa metabolit sekunder seperti tanin dan flavanoid. Sedangkan pelarut air dapat melarutkan senyawa yang bersifat polar seperti flavanoid dalam bentuk glikosida dan dalam bentuk bebas (Markam, 1988).

Partisi dilakukan dengan mengambil 10 gram ekstrak aktif dilarutkan dengan aquadest hingga homogen. Kemudian dimasukkan kedalam corong pisah lalu ditambahkan dengan pelarut n-heksan sebanyak 1:10 (v/v), dikocok berulang kali hingga homogen hingga membentuk 2 lapisan. Masing-masing lapisan ditampung. Diulangi hingga larutan berwarna bening. Partisi dilakukan dengan cara yang sama menggunakan pelarut kloroform, etil asetat hingga diperoleh hasil partisi berupa fraksi n-heksan, fraksi kloroform, fraksi etil asetat dan fraksi air.

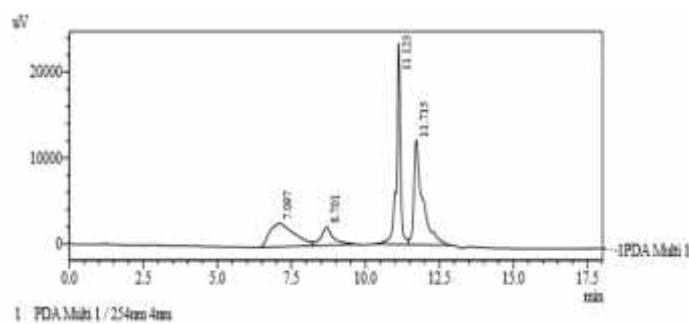
Hasil partisi dari 10 gram ekstrak pucuk daun kedondong (*Spondias pinnata* (Lf). Kurz), diperoleh 4,3 gram ekstrak n-heksan, 0,17 gram ekstrak kloroform, 1,87 gram ekstrak etil asetat, dan 3,5 gram ekstrak air. Hasil ini dimungkinkan, komponen senyawa yang terdapat dalam ekstrak pucuk kedondong lebih tertarik kedalam pelarut polar dan non polar. Hasil rendamen partisi ekstrak dapat dilihat pada tabel 7.

Tabel 7. Hasil rendamen partisi ekstrak cair-cair pucuk daun kedondong

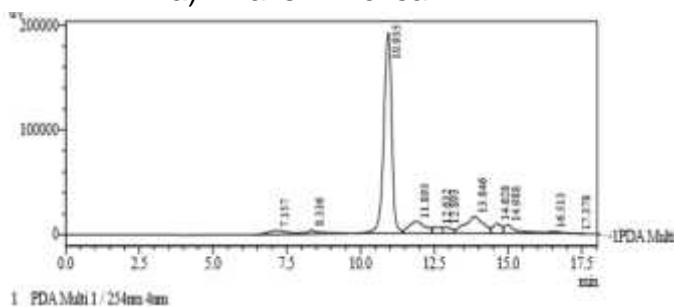
Berat ekstrak (g)	Fraksi n -hexan (g)	Fraksi Kloroform (g)	Fraksi etil asetat (g)	Fraksi air (g)
10 gram	4,3 gram	0,17 gram	1,87 gram	3,5 gram

Selanjutnya dari 4 fraksi tersebut dilakukan pengujian perbandingan profil kromatogram dengan metode UFLC. Dan dilanjutkan dengan aktivitas antibakteri untuk mengetahui fraksi mana yang memiliki aktivitas antibakteri. Fraksi yang memiliki aktivitas antibakteri tersebut selanjutnya dilakukan pengujian KLT bioautografi yang umumnya digunakan untuk mendeteksi aktivitas antimikroba.

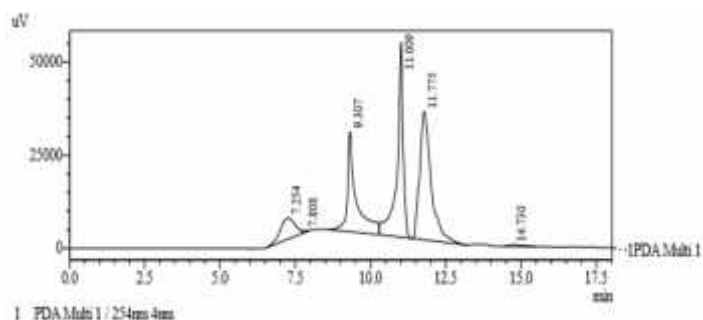
G. Hasil Perbandingan Profil Kromatogram Fraksi (n-Heksan, Etil Asetat, Kloroform Dan Air) Pada Panjang Gelombang 254 nm



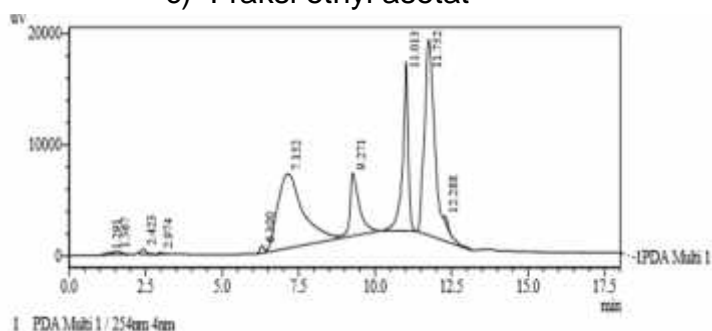
a) Fraksi n-heksan



b) Fraksi kloroform



c) Fraksi ethyl asetat



d) Fraksi air

Gambar 5: Profil kromatogram fraksi (n-heksan, ethyl Asetat, kloroform dan air) pada panjang gelombang 254 nm. (a) fraksi n-heksan (b) fraksi kloroform c) fraksi ethyl asetat (d) fraksi air

Tabel 8: Perbandingan waktu retensi dan luas area fraksi n-heksan, kloroform, ethyl asetat dan air, pada panjang gelombang 254 nm

Waktu Retensi (Menit)	Luas Area			
	N-Heksan	Kloroform	Ethyl asetat	Air
1,29	-	-	-	3193
1,56	-	-	-	5130
2,42	-	-	-	6016
2,97	-	-	-	1514
6,30	-	-	-	6165
7,09	156366	-	-	-
7,15	-	168609	-	384861
7,25	-	-	190387	-
7,80	-	-	6050	-
8,33	-	111764	-	-

8,70	61676	-	-	-
9,27	-	-	-	119175
9,30	-	-	729115	-
10,93	-	3595957	-	-
11,00	-	-	729115	-
	-	-	-	190529
11,01				
11,71	249100	-	-	-
11,12	217357	-	-	-
11,75	-	-	-	429921
11,77	-	-	918997	-
11,89	-	443420	-	-
12,28	-	-	-	3822
12,63	-	124770	-	-
12,89	-	118615	-	-
13,84	-	695254	-	-
14,62	-	191105	-	-
14,96	-	191105	-	-
16,51	-	63307	-	-
17,37	-	1529	-	-

Analisis profil kromatogram masing-masing fraksi dengan menggunakan UFLC dengan panjang gelombang 254 nm menunjukkan waktu retensi yang berbeda-beda. Namun dari profil kromatogram tersebut memiliki puncak kromatogram yang hampir sama pada masing-masing fraksi. Dapat dilihat pada Gambar 5 dan Tabel 8.

Dari hasil analisis pada panjang gelombang 254 nm terdapat 1 waktu retensi yang sama yaitu pada 7,15 menit muncul pada senyawa kloroform dan air.

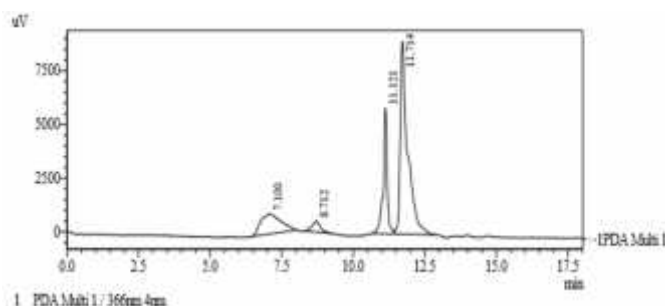
Pada 1,29 menit hingga 6,30 menit terdapat 6 peak yang muncul pada fraksi air tetapi tidak muncul pada fraksi n-heksan, kloroform dan ethyl asetat. Menunjukkan adanya senyawa polar.

Pada 7 menit, 8 menit, 11 menit dari masing–masing fraksi memiliki puncak yang hampir sama. Kemungkinan disebabkan adanya komponen kimia heksan, ethyl asetat dan air masih belum terekstraksi sempurna .

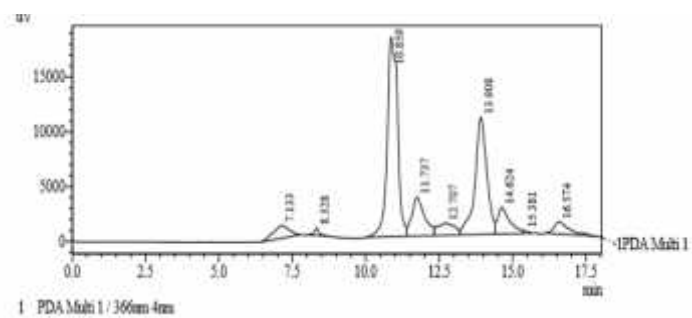
Pada 12 menit sampai 17 menit terdapat beberapa peak yang muncul pada fraksi air tetapi tidak muncul pada fraksi n-heksan, kloroform dan ethyl asetat. Menunjukkan adanya senyawa semipolar.

Berdasarkan hasil perbandingan profil kromatogram dengan UFLC pada panjang gelombang 254 nm dari masing-masing ekstrak tersebut dapat dilihat, komponen senyawa yang dimiliki dari masing-masing fraksi berpengaruh pada luas area dan puncak yang dimiliki pada masing-masing fraksi. Dapat dilihat dengan adanya sinyal-sinyal yang ada pada masing-masing kromatogram. Hal ini berpengaruh terhadap aktivitas antibakteri pada masing-masing fraksi.

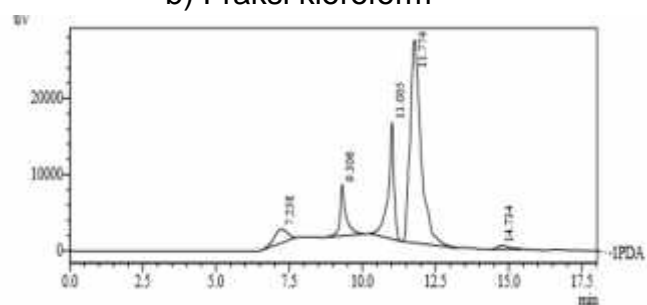
H. Hasil Perbandingan Profil Fitokimia Fraksi Ekstrak Etanol Pucuk Daun Kedondong Pada Panjang Gelombang 366 nm.



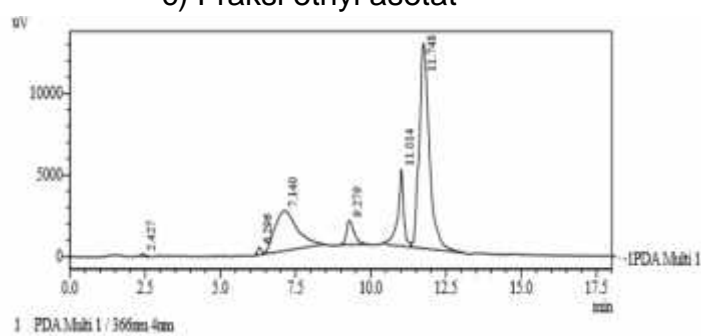
a) Fraksi n-heksan



b) Fraksi kloroform



c) Fraksi ethyl asetat



d) Fraksi air

Gambar 6: Profil kromatogram fraksi (n-heksan, ethyl asetat, kloroform dan air) pada panjang gelombang 366 nm. (a) fraksi n-heksan (b) fraksi kloroform c) fraksi ethyl asetat (d) fraksi air

Tabel 9: Perbandingan waktu retensi dan luas area fraksi n-heksan, kloroform, ethyl asetat dan air, pada panjang gelombang 366 nm

Waktu Retensi (Menit)	Luas Area			
	n-Heksan	Kloroform	Ethyl asetat	Air
2,42	-	-	-	1024
6,29	-	-	-	4601
7,10	45579	-	-	-
7,13	-	42670	-	-
7,23	-	-	58965	-
7,14	-	-	-	129198
8,32	-	7525	-	-
8,71	10264	-	-	-
9,30	-	-	94752	-
9,27	-	-	-	26394
10,85	-	448147	-	-
11,12	55969	-	-	-
11,71	161177	-	-	-
11,73	-	107210	-	-
11,00	-	-	212513	-
11,77	-	-	691677	-
11,01	-	-	-	64132
11,74	-	-	-	294043
12,70	-	46179	-	-
13,90	-	301078	-	-
14,62	-	69167	-	-
14,73	-	-	691677	-
15,38	-	2355	-	-
16,57	-	39033	-	-

Analisis profil kromatogram masing-masing fraksi dengan menggunakan UFLC dengan panjang gelombang 366 menunjukkan waktu retensi yang berbeda-beda. Namun dari profil kromatogram tersebut memiliki puncak kromatogram yang hampir sama pada masing-masing fraksi. Dapat dilihat pada Gambar 6 dan Tabel 9.

Pada 1,24 menit hingga 6,29 menit terdapat 6 peak yang muncul pada fraksi air tetapi tidak muncul pada fraksi n-heksan, kloroform dan ethyl asetat. Menunjukkan adanya senyawa polar.

Pada 7 menit, 8 menit, 11 menit dari masing – masing fraksi memiliki puncak yang hampir sama. Kemungkinan disebabkan adanya komponen kimia heksan, ethyl asetat dan air masih belum terekstraksi sempurna.

Pada 12 menit sampai 17 menit terdapat beberapa peak yang muncul pada fraksi kloroform tetapi tidak muncul pada fraksi n-heksan, kloroform dan ethyl asetat. Menunjukkan adanya senyawa semipolar.

d) Aktivitas Antibakteri Dari Masing-Masing Fraksi

Pengujian aktivitas antibakteri untuk masing-masing fraksi dilakukan sama dengan pengujian yang ada pada ekstrak dengan konsentrasi yang sama yaitu 10% (b/v), menggunakan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Pengujian dilakukan secara triplo. Berdasarkan hasil pengujian aktivitas antibakteri dari berbagai fraksi menunjukkan bahwa fraksi yang memiliki daya hambat yaitu fraksi heksan memiliki aktivitas antibakteri sebesar 13,27 mm dan 12,91 mm, fraksi ethyl asetat sebesar 12,49 mm dan 12,41 mm, Sedangkan fraksi air dan kloroform tidak terlihat adanya zona hambatan. Hasil dapat dilihat pada tabel 10 dan tabel 11.

Hasil menunjukkan bahwa senyawa yang paling aktif pada daun kedondong (*Spondias pinnata* (Lf).Kurz) dalam menghambat pertumbuhan

bakteri *Staphylococcus aureus* dan *pseudomonas aeruginosa* adalah senyawa yang bersifat non polar, semi polar.

Berdasarkan penelitian Jain *et al* (2014), aktivitas antibakteri *Staphylococcus aureus* yang memiliki daya hambatan tertinggi pada beberapa ekstrak adalah pada ekstrak heksan sebesar 28.67 ± 0.58 , ethyl asetat 18.67 ± 1.15 , etanol 24.67 ± 1.53 . Sedangkan pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* memiliki penghambatan pada ekstrak heksan sebesar 22.00 ± 0.00 mm, etil asetat sebesar 16.00 ± 1.73 mm dan etanol sebesar 21.0 ± 1.00 .

Tabel 10: Hasil uji daya hambat ekstrak etanol daun kedondong pada masing-masing fraksi dalam tiga replikasi terhadap penghambatan pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*

Perlakuan	Diameter Zona Hambat (mm)			Rata-rata (mm)
	Replikasi I	Replikasi II	Replikasi III	
Ekstrak n-hexan	12,83	12,83	14,16	13,27
Ekstrak kloroform	-	-	-	-
Ekstrak Ethyl asetat	11,33	11,83	14,33	12,49
Ekstrak Air	-	-	-	-

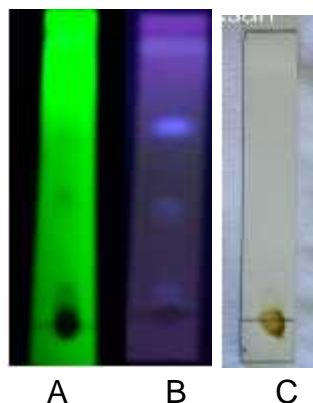
Tabel 11: Hasil uji daya hambat ekstrak etanol daun kedondong pada masing-masing fraksi dalam tiga replikasi terhadap penghambatan pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa*

Perlakuan	Diameter Zona Hambat (mm)			Rata-rata (mm)
	Replikasi I	Replikasi II	Replikasi III	
Ekstrak n-hexan	12,26	12,83	13,66	12,91
Ekstrak kloroform	-	-	-	-
Ekstrak Ethyl asetat	10,4	13,33	13,5	12,41
Ekstrak Air	-	-	-	-

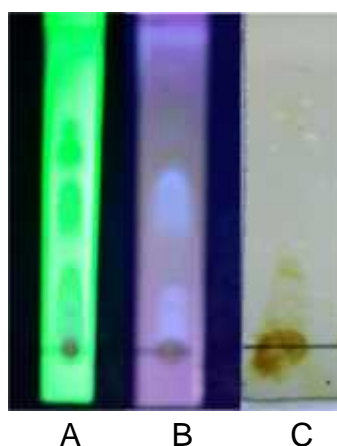
**e) Hasil KLT Bioautografi Ekstrak Etanol daun kedondong
(*Spondias pinnata* (Lf). Kurz)**

Bioautografi adalah pengujian yang dilakukan untuk mendeteksi noda atau senyawa yang terbentuk pada lempeng KLT yang mempunyai aktivitas antibakteri. Dilakukan dengan metode bioautografi kontak dengan cara menyimpan lempeng KLT hasil elusi pada fraksi n-heksan dan fraksi ethyl asetat di media agar yang telah diinokulasi dengan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*.

Sebelum dilakukan penotolan sampel pada lempeng KLT, terlebih dahulu lempeng klt diaktifkan dalam oven pada suhu 110 °C selama 15 menit dengan maksud untuk memperbesar daya absorpsi (Azizah dan salamah 2013). Setelah itu dilakukan penjuhan pelarut didalam chamber dengan memakai kertas saring dengan maksud menghindari adanya penguapan pelarut (Hanifah, 2014). Selanjutnya dari hasil partisi yang memberikan aktivitas antibakteri dilakukan pemantauan eluen dengan menggunakan beberapa konsentrasi. Hasil pemantauan pada fraksi n-heksan dan etil asetat menunjukkan eluen ethyl asetat : n-heksan (3;1) memberikan pola pemisahan yang baik, dilihat di bawah lampu UV 254 dan 366 nm. Namun pada saat penyemprotan dengan H₂SO₄ 10% pada fraksi n-heksan tidak adanya noda atau senyawa yang muncul. Tetapi pada fraksi etil asetat terdapat noda yang muncul yang berwarna kuning kehijauan. Dapat dilihat pada gambar 7 dan gambar 8



Gambar 7. Hasil KLT fraksi n- hexan, fase diam GF 254 dengan fase gerak ethyl asetat: n-hexan (3:1) . (A) hasil elusi KLT pada gelombang 254 nm (B) hasil elusi pada panjang gelombang 366 nm (C) hasil elusi KLT dengan pereaksi Semprot H₂SO₄ 10%



Gambar 8. Hasil KLT fraksi ethyl asetat, fase diam GF 254 dengan fase gerak etil asetat: n-hexan (3:1). (A) hasil elusi KLT pada gelombang 254 nm (C) hasil elusi pada panjang gelombang 366 nm. (C). hasil elusi dengan KLT dengan pereaksi semprot H₂SO₄ 10%.

Tabel 12. Hasil perhitungan Nilai Rf pada Fraksi n-heksan

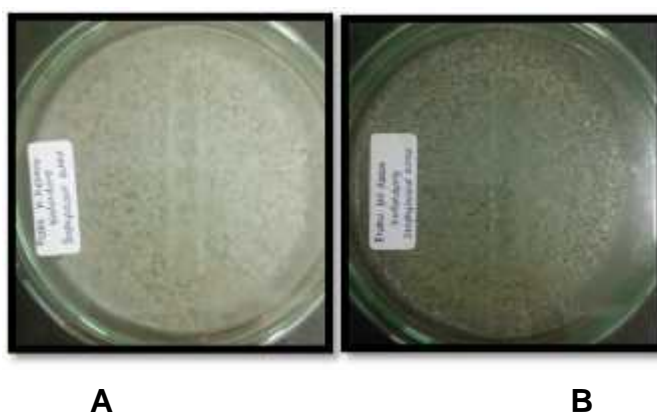
Fraksi n-heksan	Rf
Noda 1	0,83
Noda 2	0,63
Noda 3	0,43

Tabel 13. Hasil Perhitungan Nilai Rf pada Fraksi Ethyl Asetat

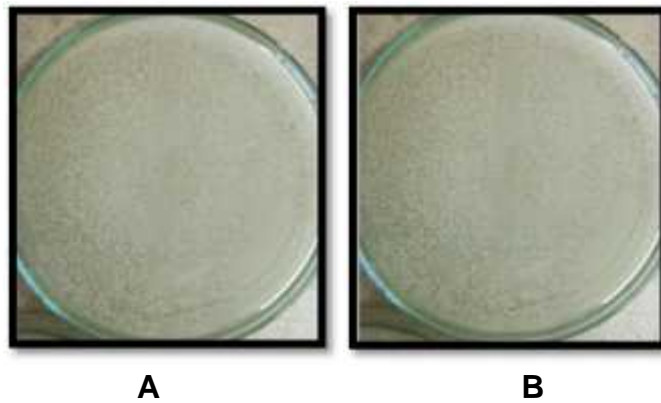
Fraksi Ethyl Asetat	Rf
Noda 1	0,73
Noda 2	0,69
Noda 3	0,56
Noda 4	0,23

Dari hasil pemantauan tersebut selanjutnya dilakukan pengujian KLT bioautografi yang merupakan pengujian untuk mendeteksi noda atau senyawa yang terbentuk pada lempeng KLT yang mempunyai aktivitas antibakteri. Aktivitas antibakteri dapat dilihat dengan melihat zona hambatan yang terbentuk.

Dari Pengujian tersebut fraksi n-heksan dan fraksi etil asetat tidak memperlihatkan adanya zona hambatan yang terbentuk. Hal ini kemungkinan disebabkan karena beberapa faktor yaitu kecilnya aktivitas antibakteri yang ada pada ekstrak. Dapat dilihat pada gambar 9 dan gambar 10.



Gambar 9: Hasil pengujian KLT bioautografi pada bakteri *Staphylococcus aureus*. (A) fraksi n-heksan, (B) fraksi ethyl asetat.



Gambar 10: Hasil pengujian KLT bioautografi pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. (A) fraksi n-heksan, (B) fraksi ethyl asetat.

BAB V

PENUTUP

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh, dapat disimpulkan bahwa:

1. Posisi daun pada masing-masing ekstrak (pucuk, tengah dan pangkal), memiliki pengaruh terhadap komposisi kandungan kimia dilihat dari luas area dan tinggi puncak berdasarkan Profil Kromatogram dengan UFLC.
2. Posisi daun pada masing-masing ekstrak (pucuk, tengah dan pangkal) memiliki pengaruh terhadap aktivitas antibakteri *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*, dimana ekstrak pucuk memiliki zona hambat rata-rata sebesar 14,30 mm dan 14,43 mm jauh lebih besar dibandingkan pada ekstrak tengah dan ekstrak pangkal.
3. Fraksi yang memiliki aktivitas antibakteri adalah fraksi n-heksan dari ekstrak pucuk dengan aktivitas antibakteri sebesar 13,27 mm dan 12,91 mm, dan fraksi ethyl asetat sebesar 12,49 mm dan 12,41 mm.

B. Saran

Untuk memastikan komponen senyawa aktif yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap masing-masing ekstrak, perlu dilakukan penelitian

lebih lanjut tentang isolasi senyawa kimia yang bertindak sebagai senyawa antibakteri.

DAFTAR PUSTAKA

- Azwanida, N. N. (2015). A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Med Aromat Plants*, 4 (196), 2167-0412.
- Azizah, B., & Salamah, N. (2013). Standarisasi Parameter Non Spesifik dan Perbandingan Kadar Kurkumin Ekstrak Etanol dan Ekstrak Terpurifikasi Rimpang Kunyit. *Pharmaciana*, 3(1).
- Azis, T., Febrizky, S., & Mario, A. D. (2014). Pengaruh jenis Pelarut Terhadap Persen Yield Alkaloid Dari Daun Salam (*Murrayakoenigii*). *Jurnal Teknik Kimia*, 20(2).
- Bora, N. S., Kakoti, B. B., Gogoi, B., & Goswami, A. K. (2014). Ethno-medicinal claims, phytochemistry and pharmacology of *Spondias pinnata*: A Review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 5(4), 1138.
- Bansal, V. (2010). High Performance liquid chromatography: a short review. *Journal of Global Pharma Technology*, 2 (5).
- Balitri, J. T. (2013). Kandungan Senyawa Kimia pada Daun Teh. *Warta Penelitian dan Pengembangan Tanaman Industri*, 19 (3), 12-16.
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12 (4), 564-582
- Cuppett, S. M., & Schrepf III, C. Hall III. 1954. *Natural Antioxidant Are They Reality*, 12-24.
- Chroma, I. M., & Grzelak, E. M. (2011). Bioautografi detection in thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1218 (19), 2684-2691.
- Das, J., Mannan, A., Rahman, M. M., Dinar, M. A. M., Uddin, M. E., Khan, I. N., & Hasan, N. (2011). Chloroform and ethanol extract of *Spondias pinnata* and its different pharmacological activity like-antioxidant, cytotoxic, antibacterial potential and phytochemical screening through in-vitro method. *Int J Res Pharmaceut Biomed Sci*, 2 (4), 1806-1812.
- DeLeon, S., Clinton, A., Fowler, H., Everett, J., Horswill, A. R., & Rumbaugh, K. P. (2014). Synergistic interactions of *Pseudomonas*

aeruginosa and *Staphylococcus aureus* in an in vitro wound model. *Infection and immunity*, 82(11), 4718-4728.

Dwija, I. B. N. P., Juniarta, I. K., Yowani, S. C., & Ariantari, N. P. (2013). Aktivitas Antituberkulosis Ekstrak Metanol Daun Kedondong Hutan (*Spondias pinnata* (LF) Kurz.). *Jurnal Kimia*, 7(1), 25-30.

Dwija, I. B., Anggraeni, M., & Ariantari, N. P. (2016). Anti Tuberculosis Activity of Forest Kedondong (*Spondias pinnata*) stem bark extract against multiple drug resistance (MDR) strain of mycobacterium tuberculosis. *Bali Medical Journal*, 5(1), 27.

Day, Jr, RA dan Underwood A.L. 2002. *Analisa Kimia Kuantitatif*. Penerjemah Lis Sopyan, Erlangga, Jakarta.

Djide MN dan Sartini. Dasar-Dasar Mikrobiologi Farmasi. Lembaga Penerbitan Universitas Hasanuddin. Makassar, 2008. Hal.75, 339.

Gandjar, I. G., & Rohman, A. (2007). Kimia farmasi analisis. *Pustaka Pelajar, Yogyakarta*, 299, 463-480.

Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. Sediaan Galenik. Jakarta. Departemen Kesehatan RI. 1986; p. 4-6, 10-12

Gelband, H., Molly Miller, P., Pant, S., Gandra, S., Levinson, J., Barter, D., & Laxminarayan, R. (2015). The state of the world's antibiotics 2015. *Wound Healing Southern Africa*, 8(2), 30-34.

Hazra, B., Biswas, S., & Mandal, N. (2008). Antioxidant and free radical scavenging activity of *Spondias pinnata*. *BMC complementary and Alternative Medicine*, 8(1), 63.

Hanifah, S. (2014). Isolasi dan Elusidasi Struktur Senyawa Metabolit Sekunder dari Ekstrak Etil Asetat Daun *Angiopteris palmiformis* (Cav.) C. Chr

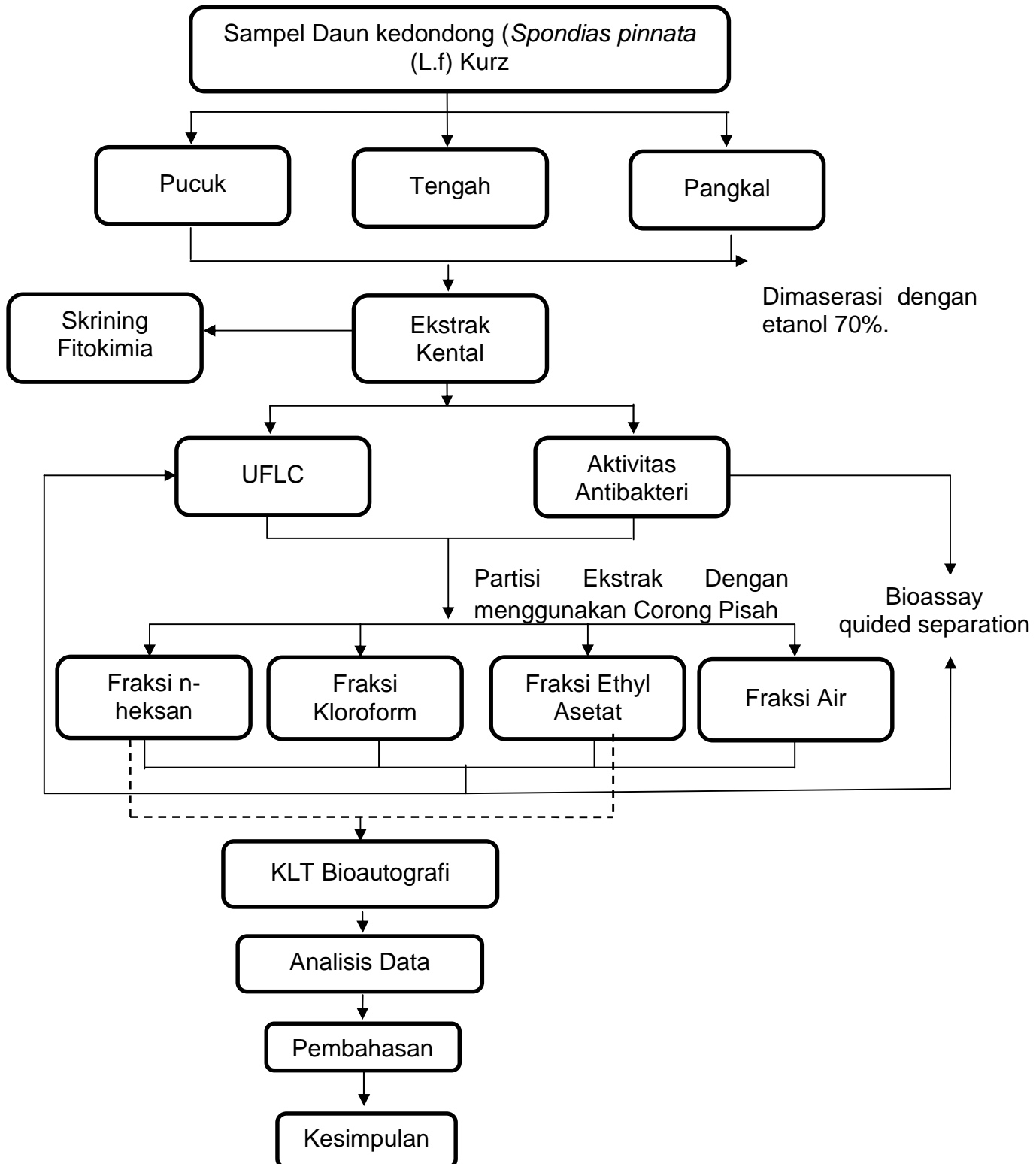
Hatijah, S.; Husain, D.R; Sartini (2013), Bioaktivitas Minyak atsiri Umbi Lapis Bawang Merah (*Alium Cepa*L). Lokal Asal Bima terhadap Bakteri *Stertococcus mutans* Penyebab Karies Gigi, Universitas Hasanuddin, Fakultas Farmasi, (Naskah Publikasi).

Harborne JB. 1987. *Metode Fitokimia*. Padmawinata K, Soediro I, penerjemah; Niksolihin S, editor. Bandung: ITB. Terjemahan dari: *Phytochemical Method*

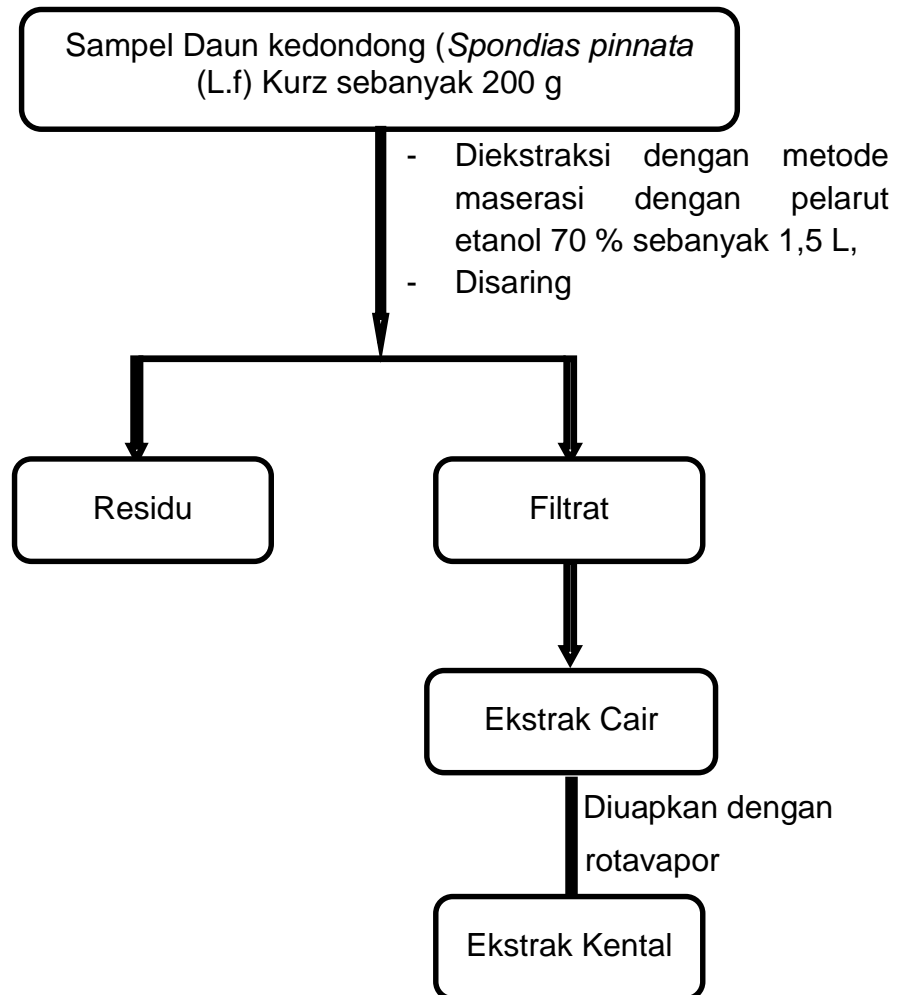
- Harmanto.N. (2002). Sehat dengan Ramuan Tradisional Cetakan Keempat PT Agromedia Pustaka, Tangerang
- Harris, L. G., Foster, S. J., and Richards, R. G., (2002), An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials: Review, *Europ. Cells and Mat.*, 4: 39-60.
- Haqiqi, S. H. (2008). Kromatografi Lapis Tipis. Tersedia <http://nadjeeb.files.wordpress.com/2009/10/kromatografi.pdf>. [10 April 2016].
- Hariyani, H., Widaryanto, E., & Herlina, N. (2015). Pengaruh Umur Panen Terhadap Rendemen Dan Kualitas Minyak Atsiri Tanaman Nilam (*Pogostemon Cablin Benth.*). *Jurnal ProduksiTanaman*, 3 (3).
- Inayati, Hurri.(2007). Potensi Antibakteri Ekstrak Daun Kedondong Bangkok (*Spondias dulcis* Forst) Program Studi Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Intitut Pertanian Bogor.
- Jain, P., Hossain, K. R., Mishu, T. R., & Reza, H. M. (2014).Antioxidant and Antibacterial Activities of *Spondias pinnata* Kurz. Leaves.
- Keawsa-ard, S. and B. Liawruangrath (2009). Antimicrobial Activity of *Spondias pinnata* (LF). *Kurz. Pure and Applied Chemistry International Conference*, p. 428-429.
- Lewis, K. (2013). Platforms for antibiotic discovery. *Nature reviews Drug discovery*, 12 (5), 371.
- Mayasari, E. (2006). *Pseudomonas aeruginosa*; Karakteristik, Infeksi dan Penanganan.
- Markam, K. M., 1988, *Cara mengidentifikasi flavanoid* Institute Teknologi Bandung 1-173.
- Meyers, C. L. F., & Meyers, D. J. (2008).Thin-layer chromatography. *Current protocols in nucleic acid chemistry*, A-3D.
- Nile, S. H., & Park, S. W. (2015). HPTLC densitometry method for simultaneous determination of flavonoids in selected medicinal plants. *Frontiers in Life Science*, 8 (1), 97-103.
- Nguyen, A. T., & Oglesby-Sherrouse, A. G. (2016). Interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* during co-

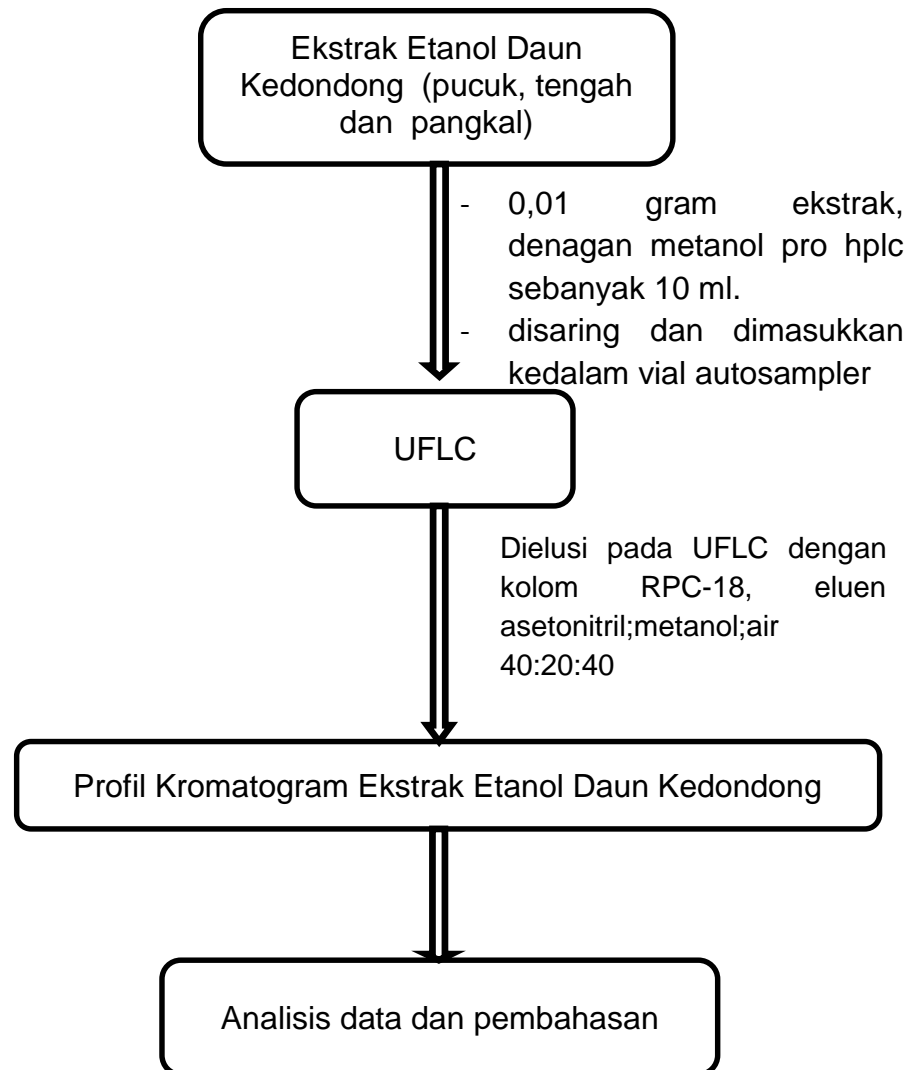
- cultivations and polymicrobial infections. *Applied microbiology and biotechnology*, 100 (14), 6141-6148.
- Oyama, M. O., Malachi, O. I., & Oladejo, A. A. (2016). Phytochemical Screening and Antimicrobial Activity of Leaf Extract of *Jatropha curcas*. *Journal of Advances in Medical and Pharmaceutical Sciences*, 8 (1), 1-6.
- Panda, S. K., Patra, N., Sahoo, G., Bastia, A. K., & Dutta, S. K. (2012). Anti-diarrheal activities of medicinal plants of Similipal Biosphere Reserve, Odisha, India. *Int J Med Arom Plants*, 2 (1), 123-134.
- Permata, D. A., & Asben, A. (2017). Karakteristik dan Senyawa Bioaktif Ekstrak Kering Daun Kluwih Dari Posisi Daun Yang. *Jurnal Teknologi Pertanian Andalas*, 21(2), 79-85.
- Ramayati, N. P. A., Ariantari, N. P., & Dwija, I. B. N. P. (2013). Aktivitas Antituberkulosis Kombinasi Ekstrak n-heksana Daun Kedondong Hutan dengan Rifampisin Terhadap Isolat *Mycobacterium tuberculosis*. *Strain MDR. Jurnal Farmasi Udayana*, 2(3), 74-78.
- Rajalakshmi, D dan S. Narasimhan. (1985). *Food Antioxidants: Sources and Methods of Evaluation* dalam DL Madhavi: *Food Antioxidant, Technological, Toxicological and Health Perspectives*. Marcel Dekker Inc., Hongkong: 76-77.
- Rossolini, G. M., & Mantengoli, E. (2005). Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Microbiology and Infection*, 11(s4), 17-32.
- Rohman, A. (2009). Kromatografi untuk analisis obat. *Graha Ilmu, Yogyakarta*, 1.
- Robinson, J. W. dkk. 2005. Undergraduate Instrumental Analysis. Sixth Edition Marcel Dekker, Inc. New York
- Rao, B. G., & Raju, N. J. (2010). Investigation of hepatoprotective activity of *Spondias pinnata*. *International Journal of Pharma Sciences and Research*, 1(3), 193-198.
- Rahman, M. M. (2010). Uji mutagenisitas hasil partisi ekstrak kloroform Daun ambre (*geranium radula cavan*). Terhadap *Bakteri salmonella typhimurium* ta 98, ta 100 dan ta 1535 Serta profil kandungan kimia bagian teraktif (Doctoral dissertation, Universitas Sebelas Maret).

- Savitri, 2013. Potensi Antituberkulosis Ekstrak n-Heksan Daun Kedondong Hutan (*Spondi pinnata* (L.f.) Kurz) Jurusan Farmasi – Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam – Universitas Udayana Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Umum Universitas Udayana.
- Seidel V., 2006. Initial and bulk extraction. In: Sarker SD, Latif Z, & Gray AI, editors. Natural Products Isolation. 2nd ed. Totowa (New Jersey). Humana Press Inc. hal. 31-5.
- Susilo, M. J., & Dhaniaputri, R. (2016). Analisis Potensi Pengembangan Ruang Terbuka Hijau (RTH) Di Kampus Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta. *Research Report*, (2).
- Rubiyanto, D. (2016). *Teknik Dasar Kromatografi*. Deepublish.
- Sarangi, P. P. (2011). *Biochemical characterization and antibiotic resistance of some medically important bacterial isolates* (Doctoral dissertation).
- Setyorini, H. A., Kurniatri, A. A., Adelina, R., & Adelina, A. (2016). Karakterisasi Mutu Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) dari Tiga Tempat Tumbuh. *Buletin Penelitian Kesehatan*, 44(4), 279-286.
- Satpathy, G., Tyagi, Y. K., & Gupta, R. K. (2011). Preliminary evaluation of nutraceutical and therapeutic potential of raw *Spondias pinnata* K., an exotic fruit of India. *Food Research International*, 44(7), 2076-2087.
- Tetti, M. (2014). Ekstraksi, Pemisahan Senyawa, Dan Identifikasi Senyawa Aktif. *Jurnal Kesehatan*, 7(2).
- Trisnawati, N. R., & Sugitha, I. M. Daya Hambat Ekstrak Daun Cemcem (*Spondias pinnata* (Lf) Kurz.)Terhadap *Escherichia coli* ATCC 8739SecaraInVitro.
- Vos, P. D., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K. H., and Whitman, W. B., (2009), *Bergey's manual of systematic bacteriology second edition volume three: The firmicutes*, Springer, New York, Hal, 1-433
- Wienarno, M. W. (1997). Efek Daun Katu (*Sauropus androgenus* Merr) Terhadap Diare Pada Tikus Putih. *Cermin Dunia Farmasi*, (33).

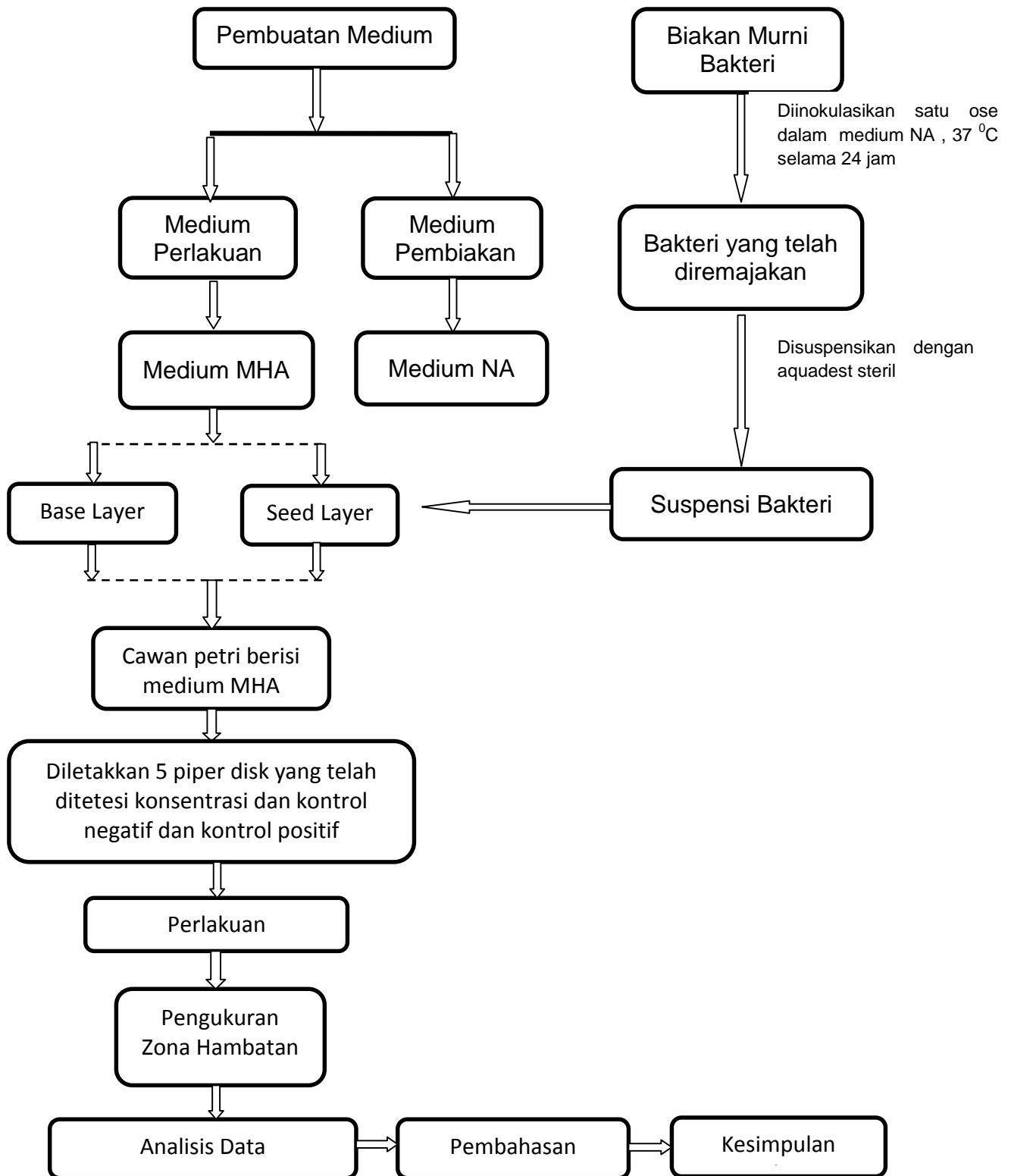
Lampiran 1: Skema Kerja Penelitian

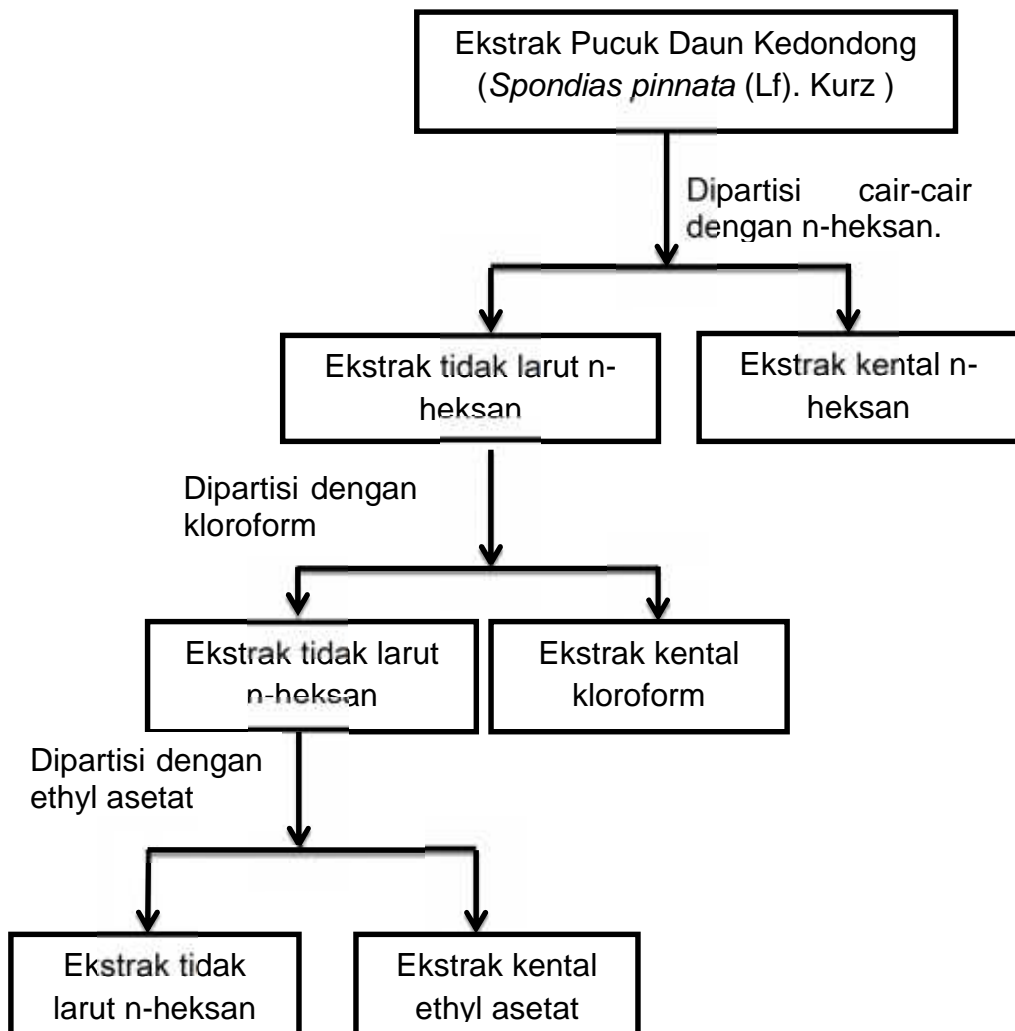
Lampiran 2: Skema Kerja Pembuatan Ekstrak Daun Kedondong (*Spondias pinnata* (L.f) Kurz)

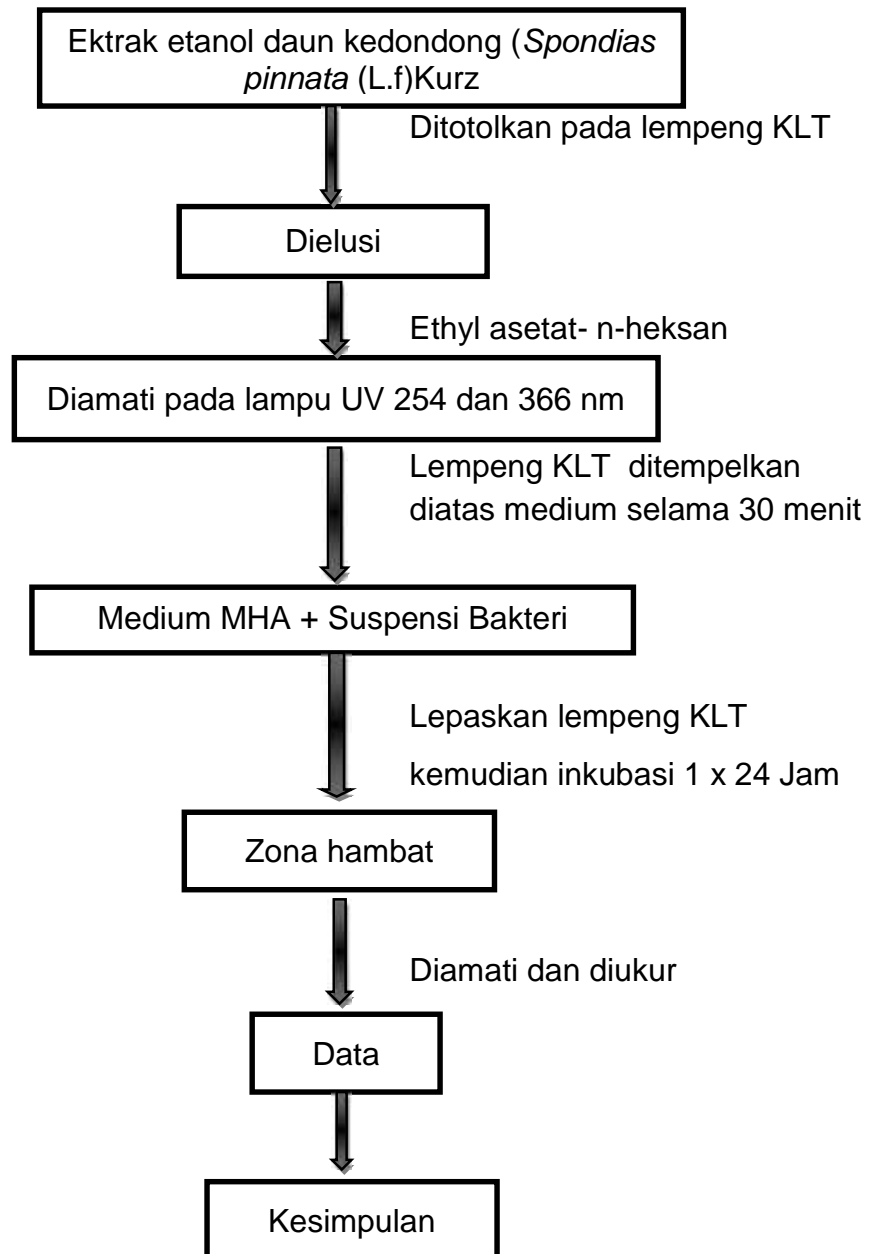


Lampiran 3: Skema Kerja Pengujian UFLC

Lampiran 4: Skema Kerja Pengujian Aktivitas Antibakteri



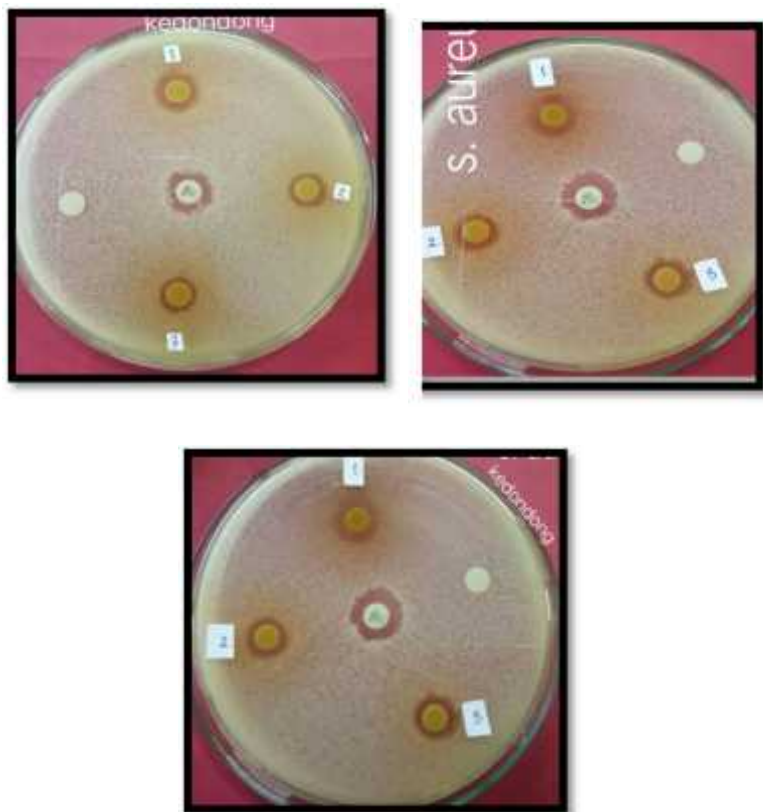
Lampiran 5: Skema Kerja Partisi Ekstrak

Lampiran 6: Skema Kerja Pengujian KLT Bioautografi

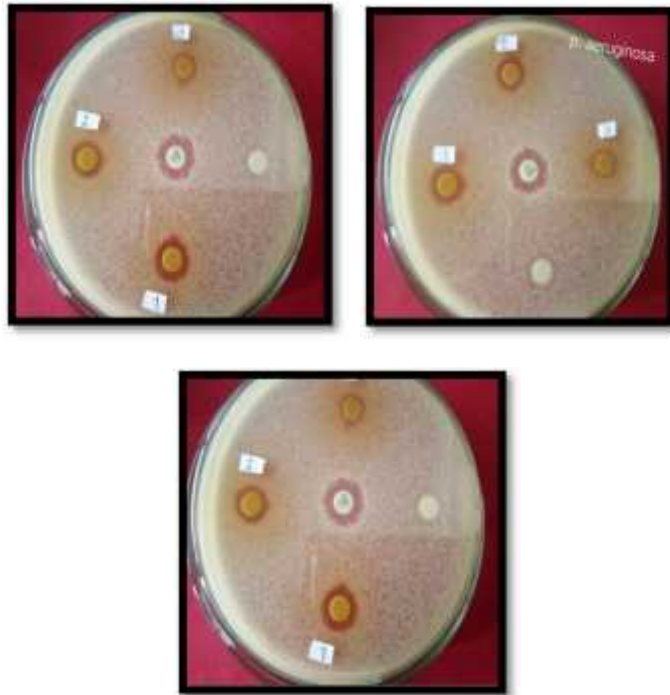
Lampiran 7: Komposisi Medium

NO	Medium	Komposisi
1.	<i>Nutrien Agar (NA)</i>	Pepton 5 gram Ekstrak daging 15 gram Air Suling ad 1000 ml pH 7,0 ±0,2
2.	<i>Mueller Hinton Agar (MHA)</i>	Ekstrak daging 30 gram Hidrolisatkasein 1,75 gram Pati 0,15 gram Agar 1,7 gram Air suling ad 1000 ml pH 7,3±0,1

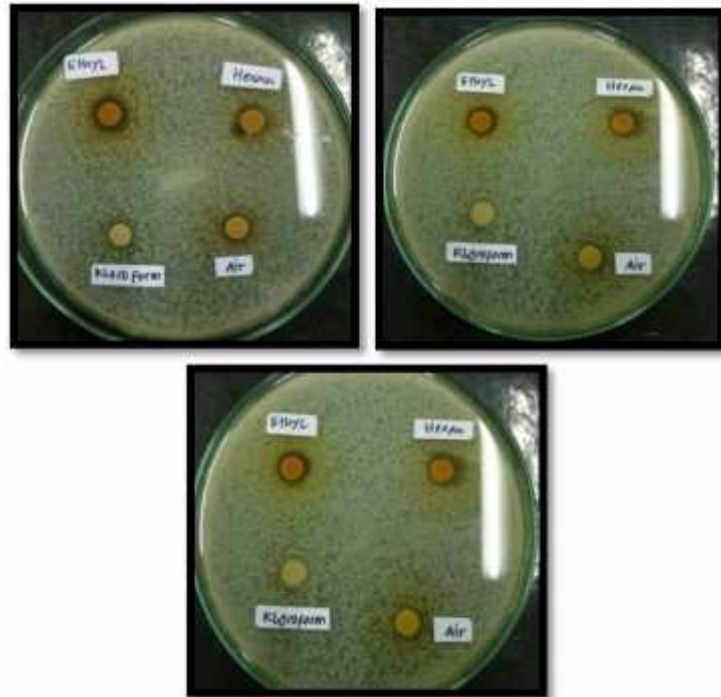
Lampiran 8: Gambar Hasil Aktivitas Antibakteri Pada Daun Kedondong (Pucuk, Tengah dan Pangkal)



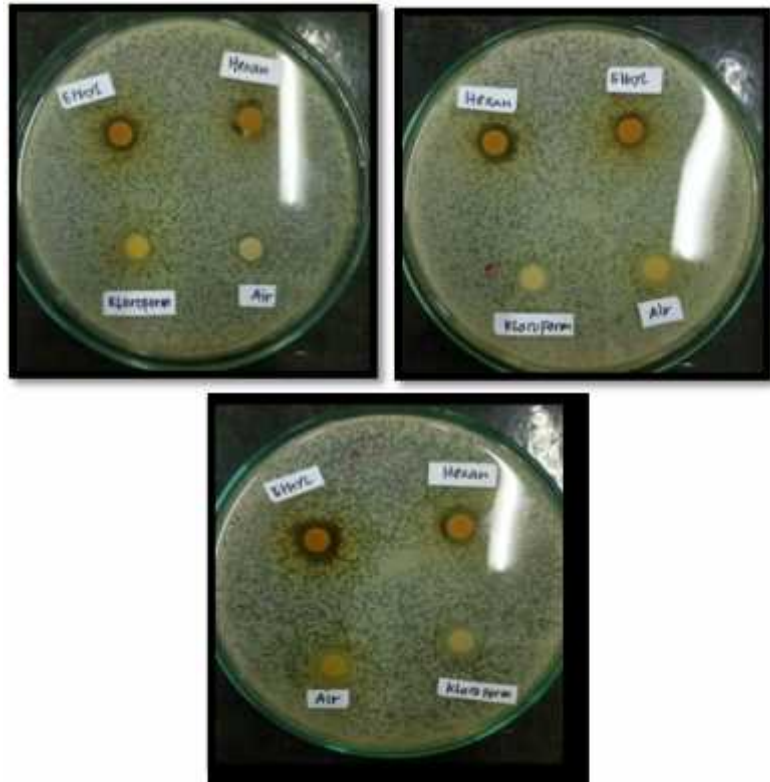
Gambar 11: Foto hasil aktivitas antibakteri *Staphylococcus aureus* ekstrak etanol daun kedondong: (1) pucuk; (2) tengah; (3) pangkal.



Gambar 12: Foto hasil aktivitas antibakteri *Pseudomonas aeruginosa* ekstrak etanol daun kedondong (pucuk, tengah dan pangkal): (1) pucuk: (2) tengah: (3) pangkal.

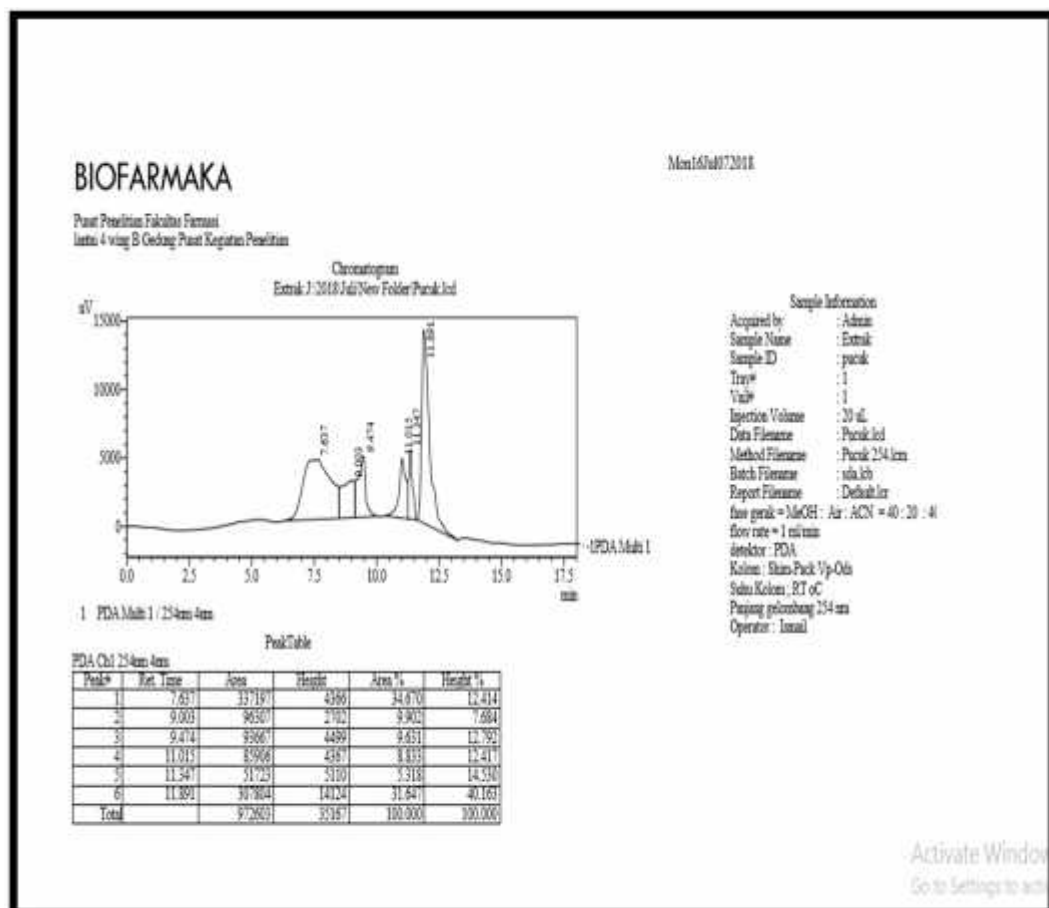


Gambar 13: Foto hasil aktivitas antibakteri *Staphylococcus aureus* fraksi ekstrak etanol pucuk daun kedondong (*Spondias pinnata* (Lf). Kurz)

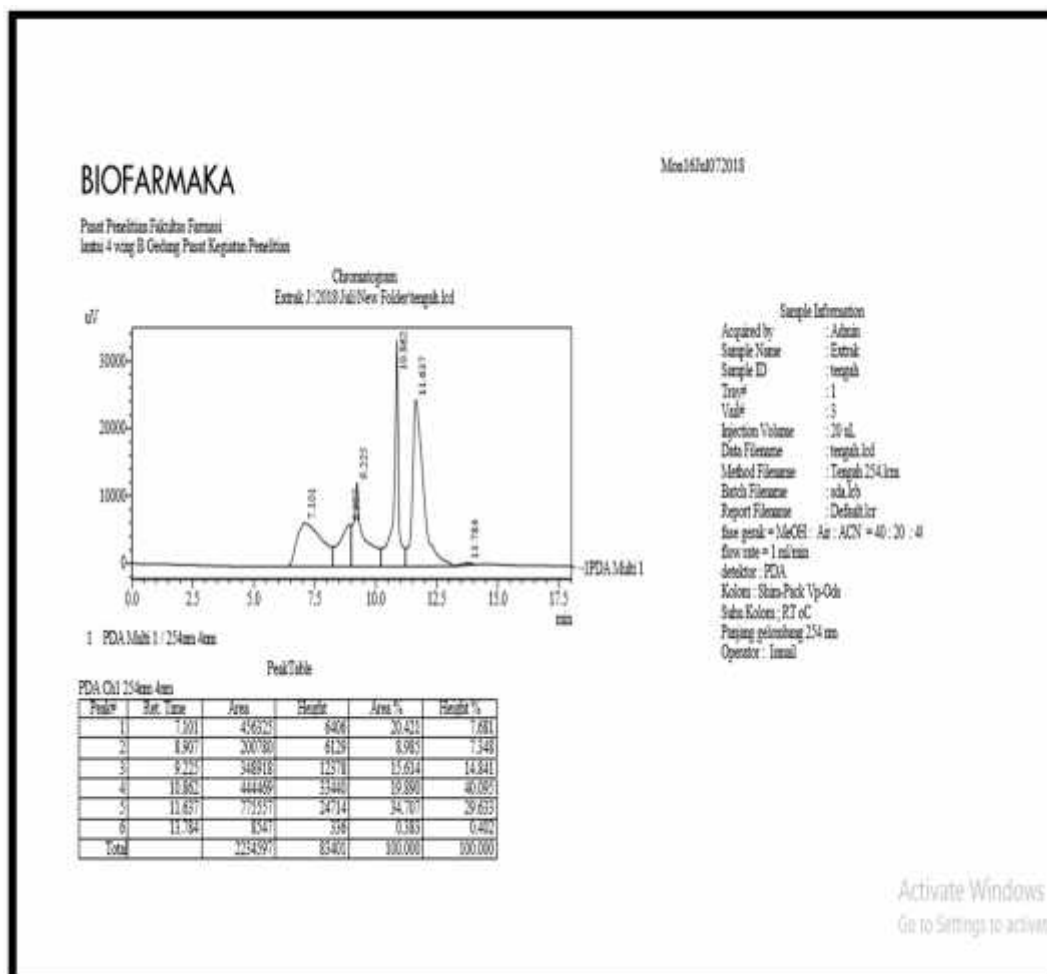


Gambar 14: Foto hasil aktivitas antibakteri *Pseudomonas aeruginosa* fraksi ekstrak etanol pucuk daun kedondong (*Spondias pinnata* (Lf). Kurz)

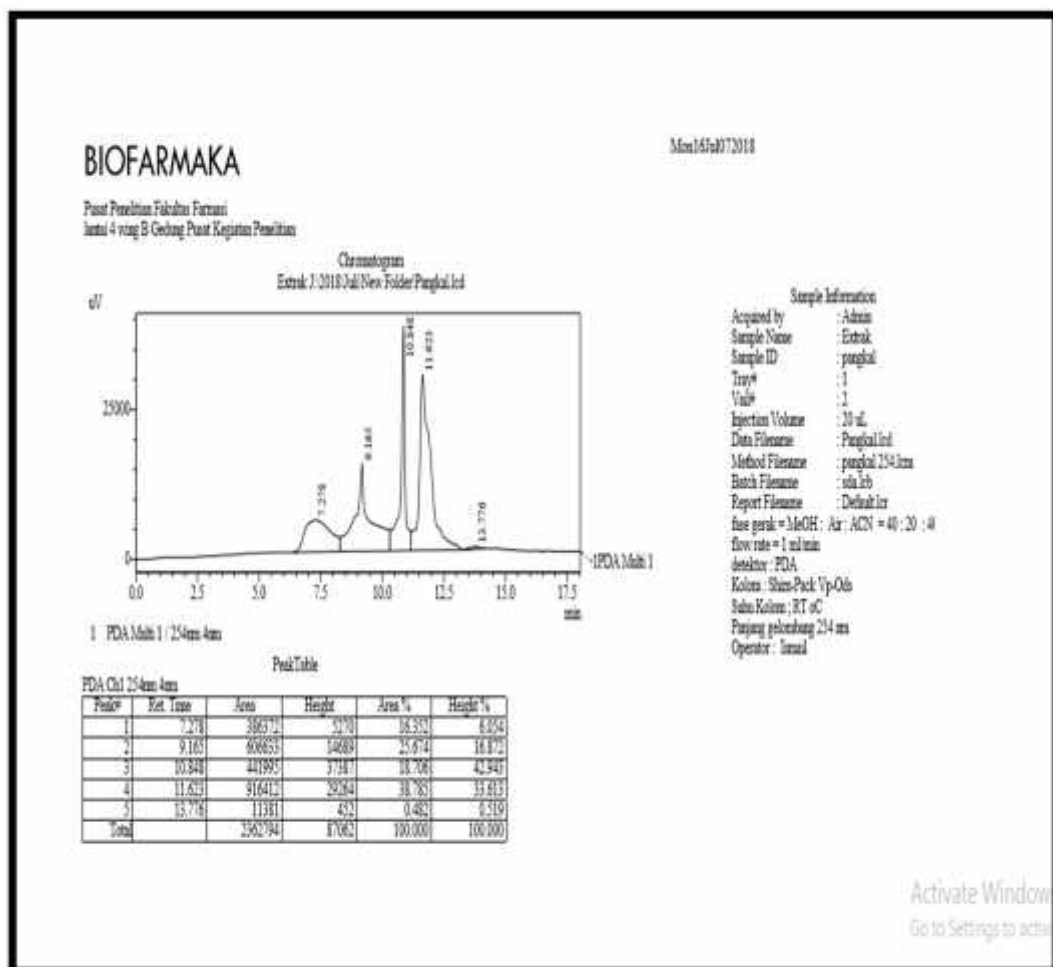
Lampiran 9 : Hasil Profil Kromatogram Pada Daun Kedondong (Pucuk, Tengah dan Pangkal) Pada UFLC Dengan Panjang Gelombang 254 nm



Gambar 15: Hasil profil kromatogram ekstrak etanol pucuk daun kedondong (*Spondias pinnata* (Lf). Kurz) .

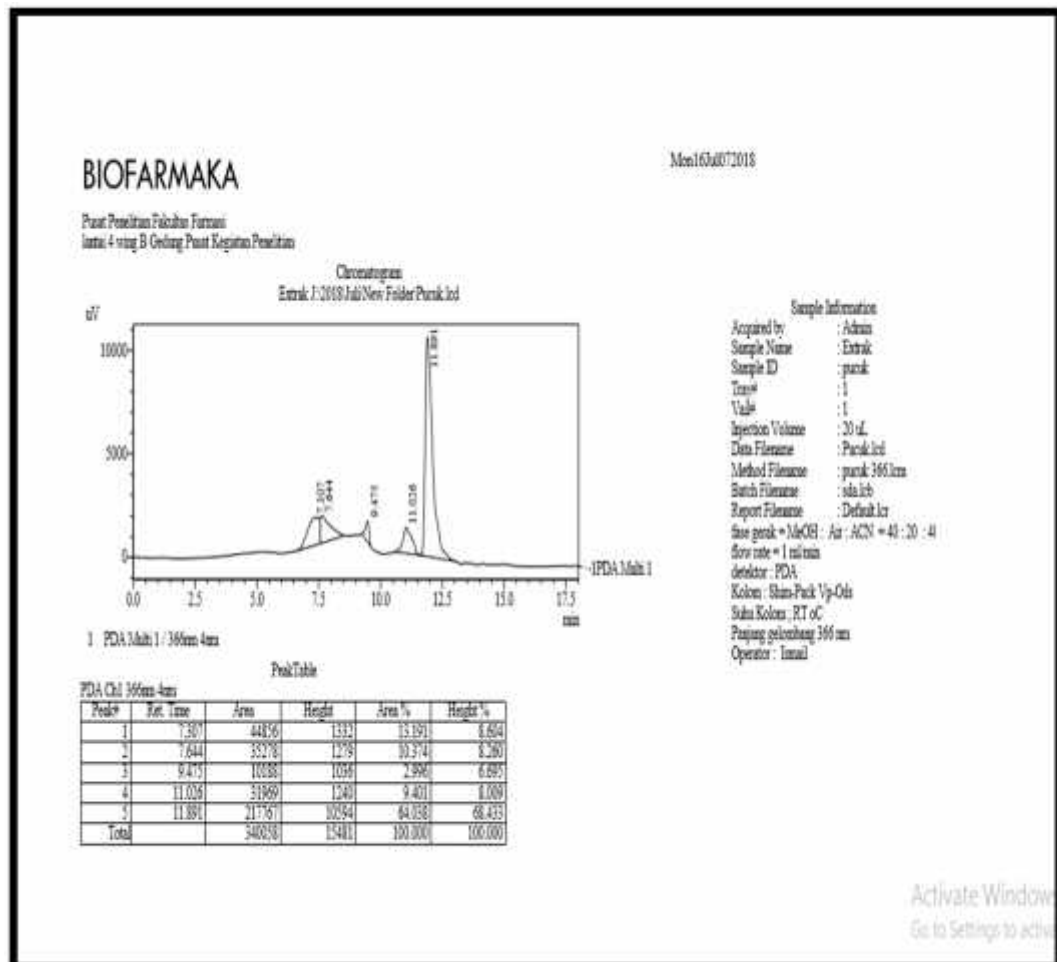


Gambar 16: Hasil profil kromatogram ekstrak etanol pucuk daun kedondong (*Spondias pinnata* (Lf). Kurz) .

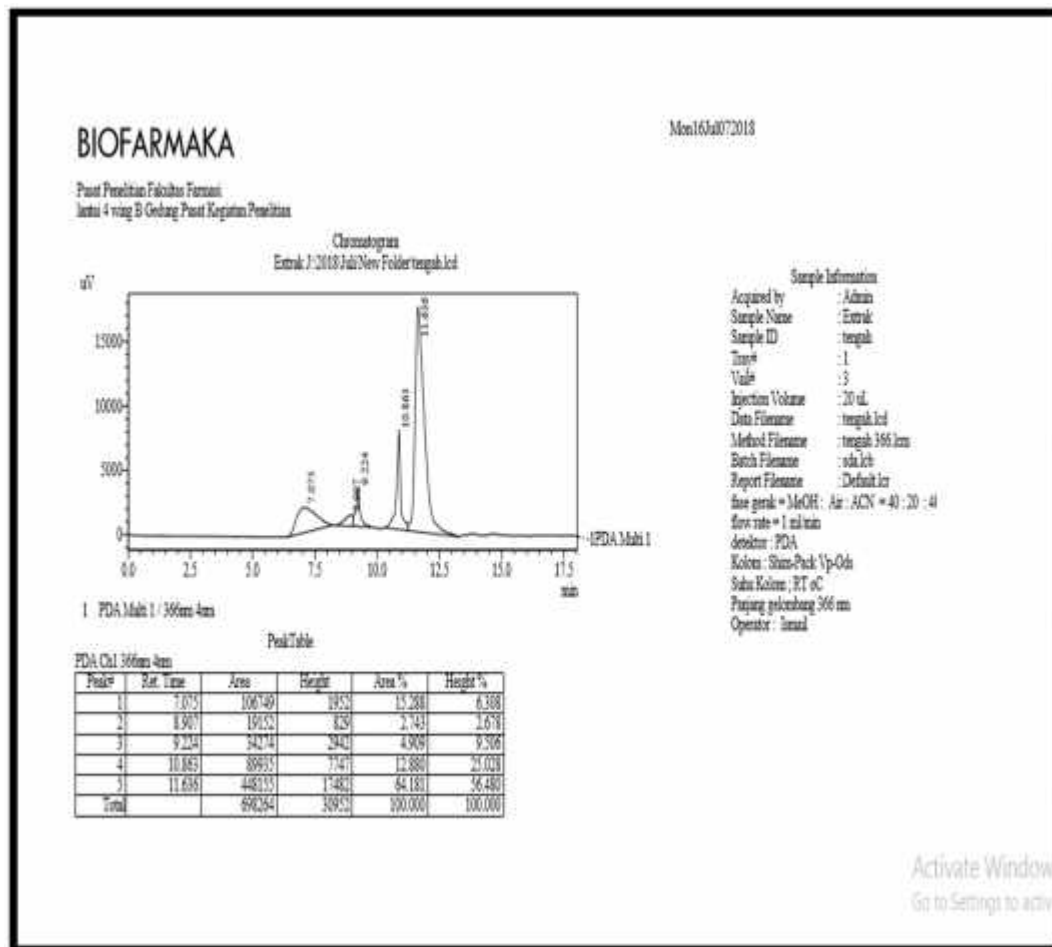


Gambar 17: Hasil profil kromatogram ekstrak etanol pangkal daun kedondong (*Spondias pinnata* (Lf). Kurz) .

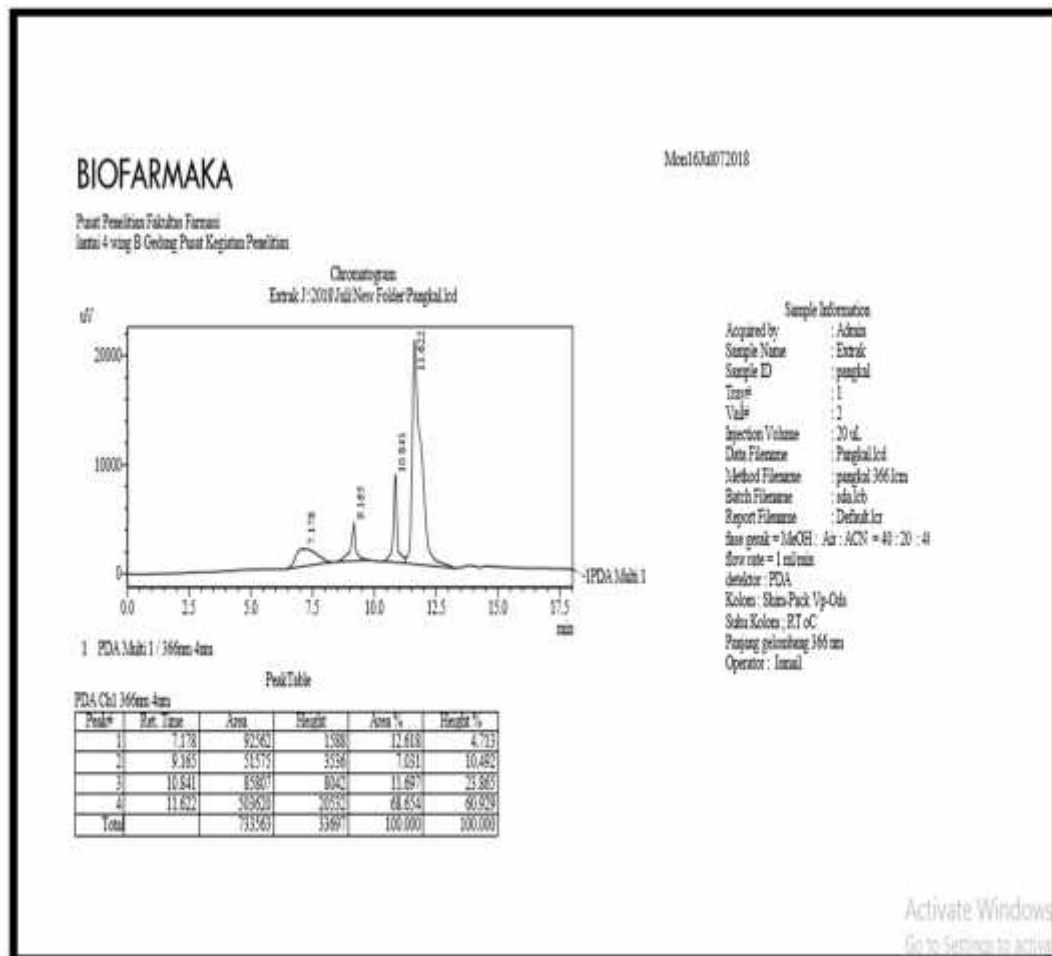
Lampiran 10: Hasil Profil Kromatogram Pada Daun Kedondong (Pucuk, Tengah dan Pangkal) Pada UFLC Dengan Panjang Gelombang 366 nm



Gambar 18: Hasil profil kromatogram ekstrak etanol pucuk daun kedondong (*Spondias pinnata* (Lf). Kurz) .

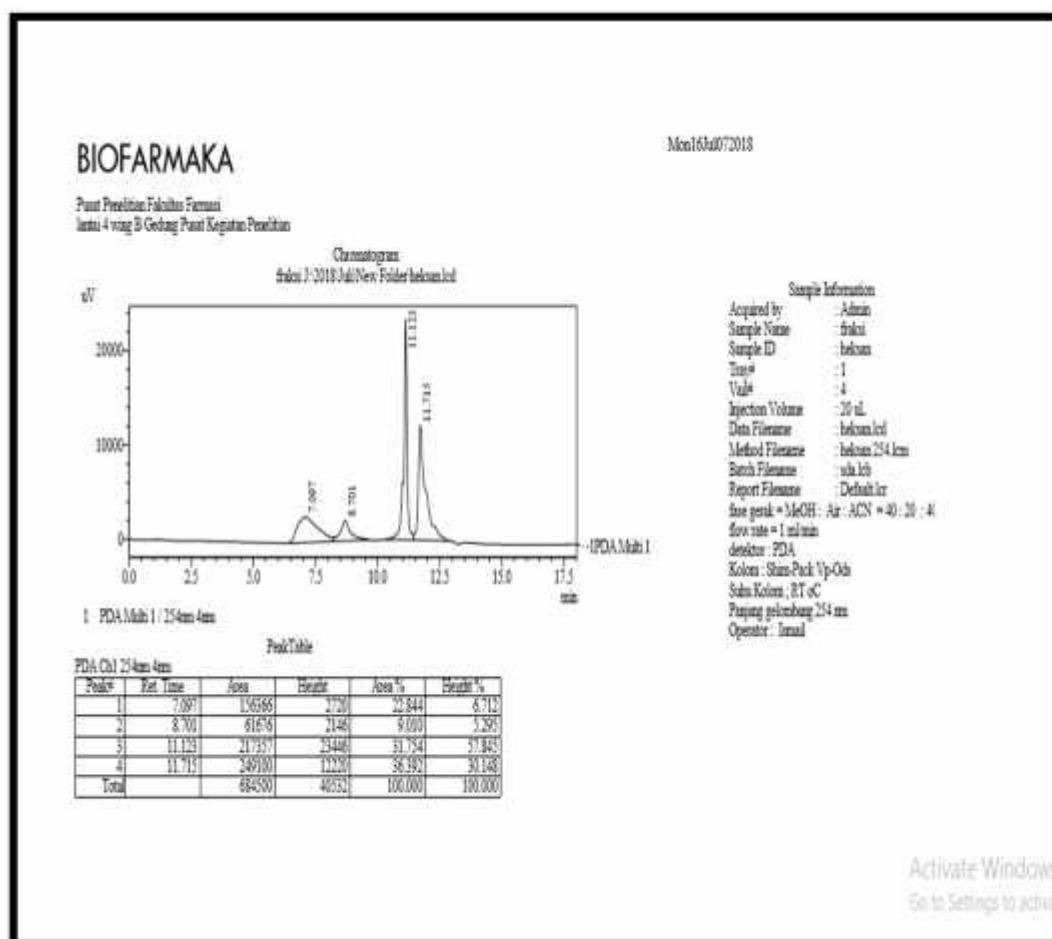


Gambar 19: Hasil profil kromatogram ekstrak etanol tengah daun kedondong (*Spondias pinnata* (Lf). Kurz) .

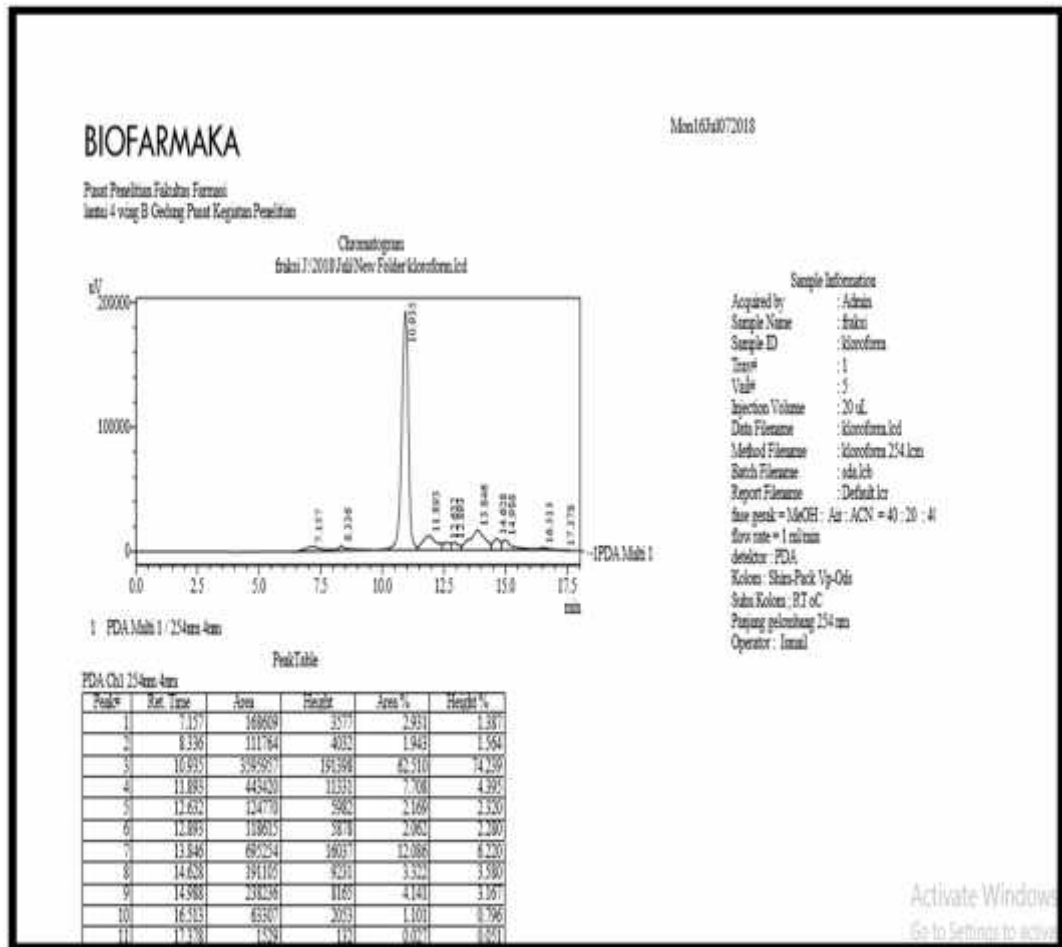


Gambar 20: Hasil profil kromatogram ekstrak etanol pangkal daun kedondong (*Spondias pinnata* (Lf). Kurz) .

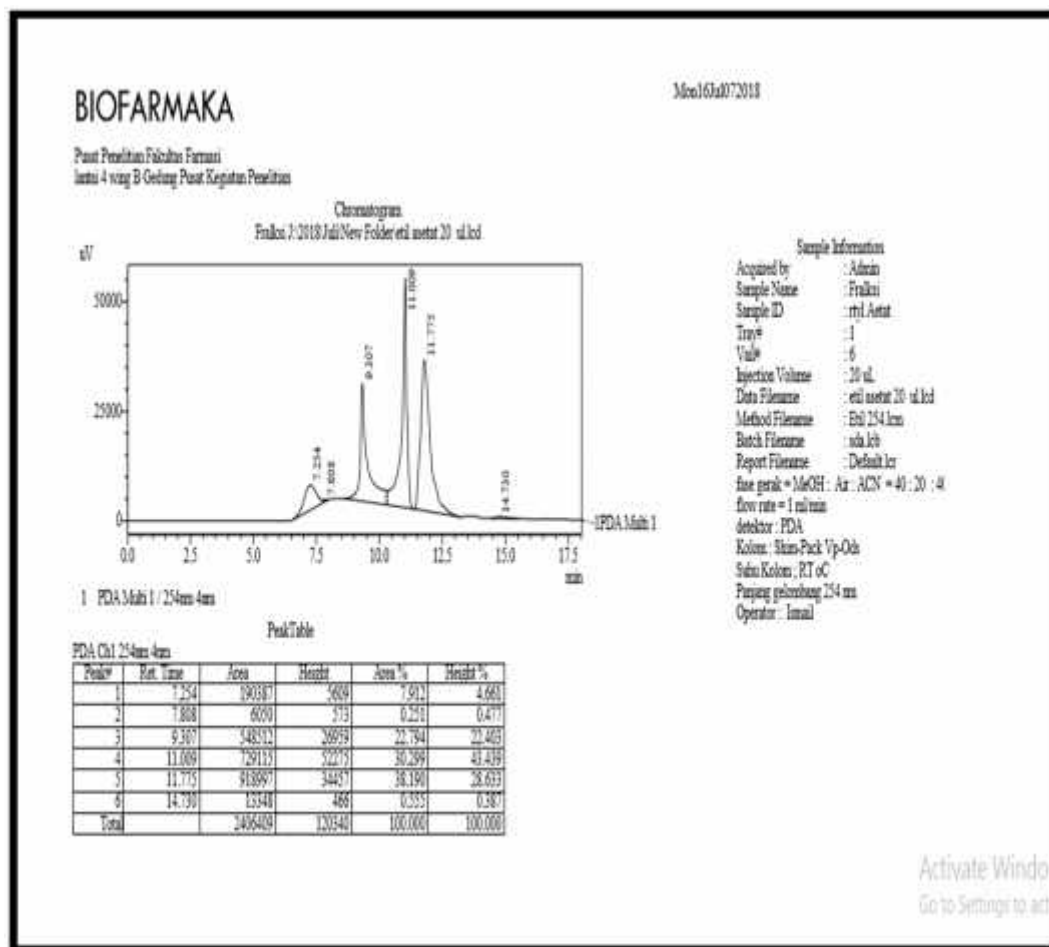
Lampiran 11: Hasil Profil Kromatogram Fraksi Ekstrak Etanol Pucuk Daun Kedondong (*Spondias pinnata* (Lf). Kurz) Dengan UFLC Pada Panjang Gelombang 254 nm.



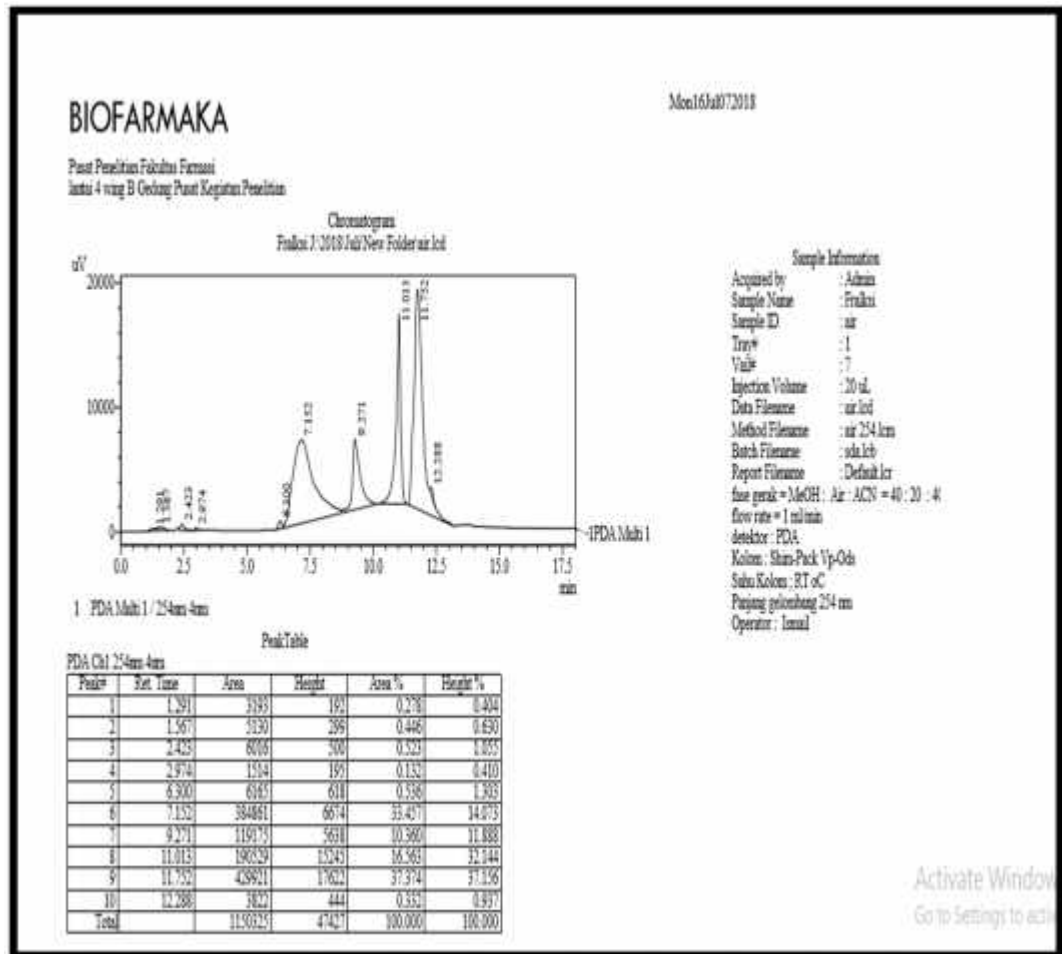
Gambar 21: Hasil profil kromatogram fraksi n- heksan



Gambar 22: Hasil profil kromatogram fraksi kloroform

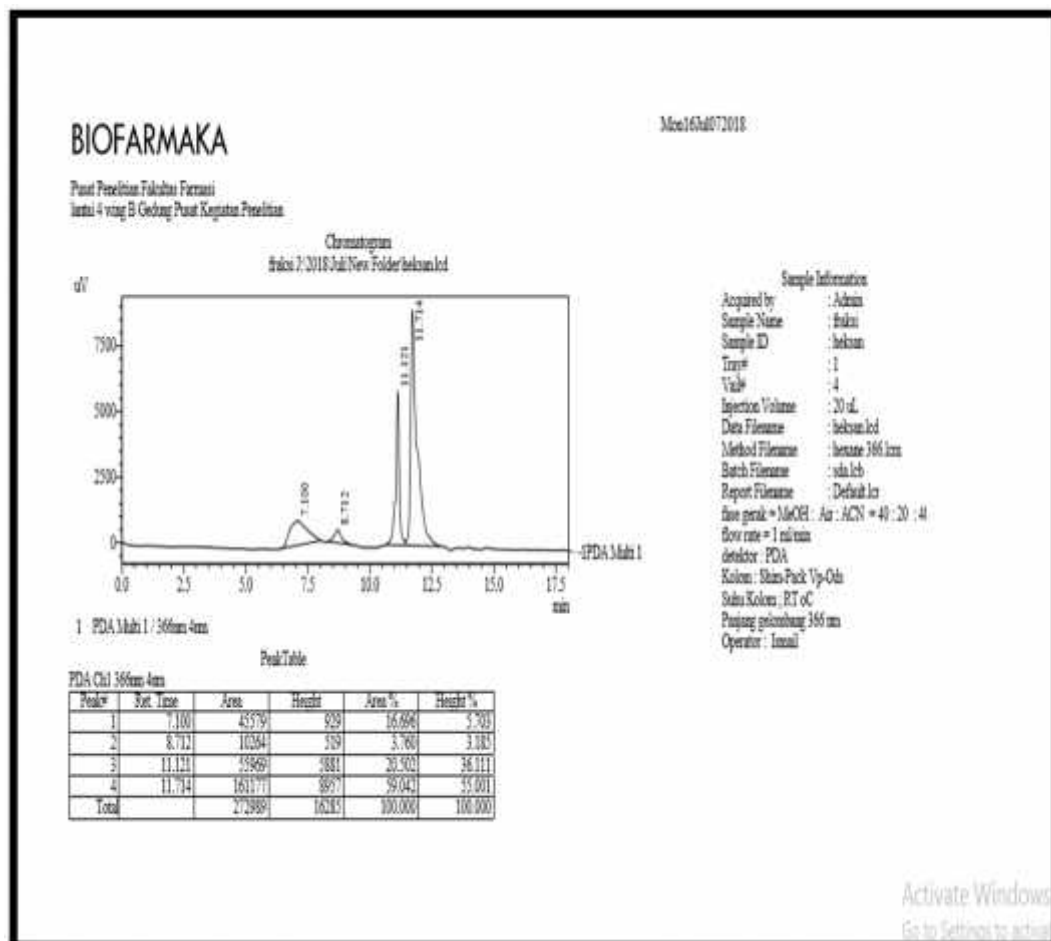


Gambar 23: Hasil profil kromatogram fraksi ethyl asetat

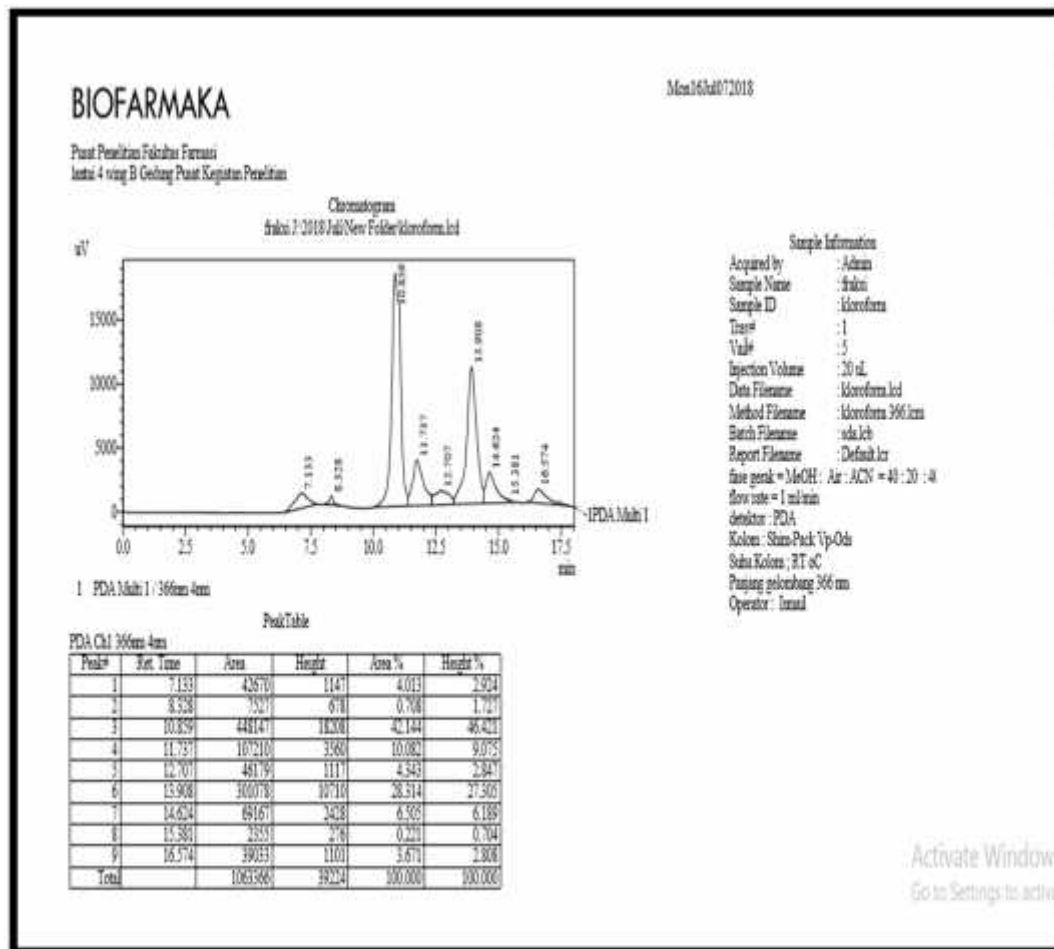


Gambar 24: Hasil profil kromatogram fraksi air

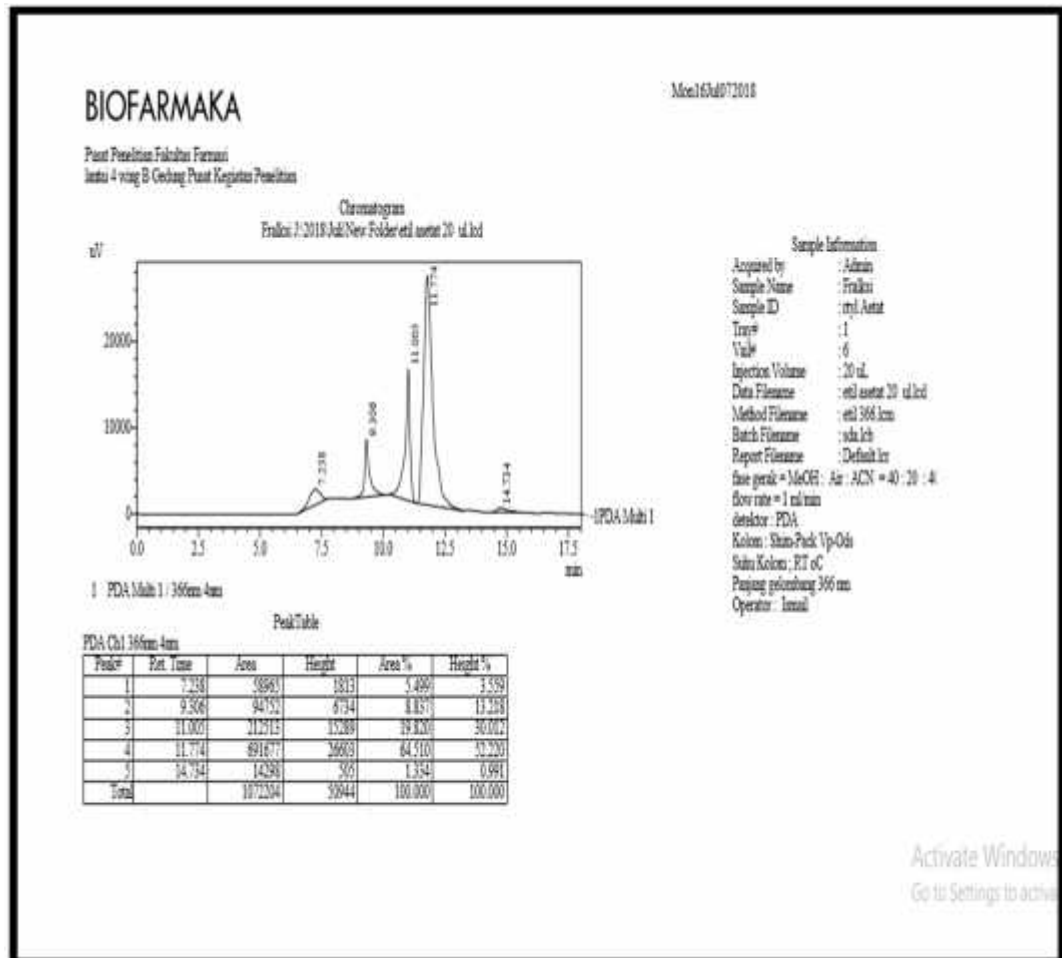
Lampiran 12: Hasil Profil Kromatogram Fraksi Ekstrak Etanol Pucuk Daun Kedondong (*Spondias pinnata* (Lf). Kurz) Pada UFLC Dengan Panjang Gelombang 366 nm.



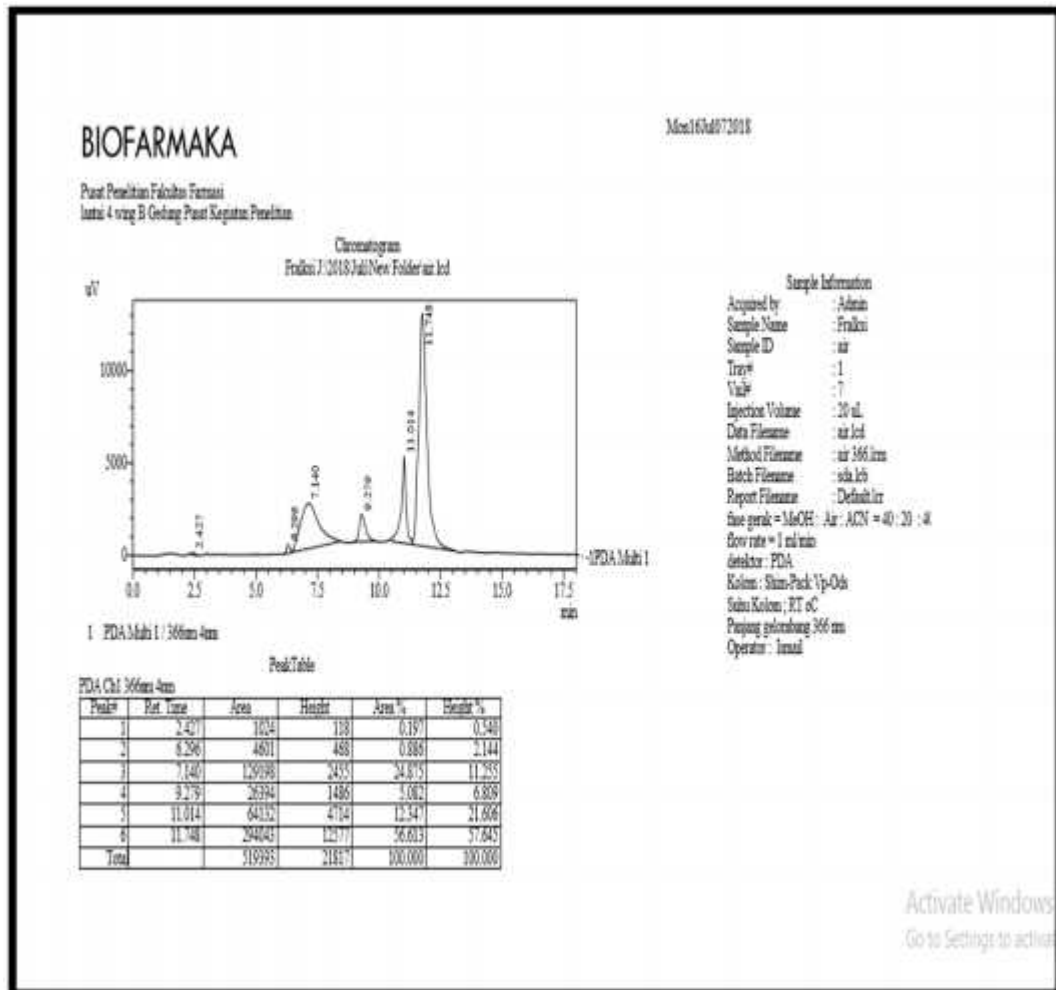
Gambar 25: Hasil profil kromatogram fraksi n-heksan



Gambar 26: Hasil profil kromatogram fraksi kloroform



Gambar 27: Hasil profil kromatogram fraksi etil asetat



Gambar 28: Hasil profil kromatogram fraksi ekstrak air

Lampiran 13: Gambar Alat-Alat Penelitian



Gambar 29: Tanaman daun kedondong (*Spondias pinnata* (Lf) Kurz)



Gambar 30: Proses maserasi ekstrak daun pucuk, tengah dan pangkal *Spondias pinnata* (Lf)Kurz).

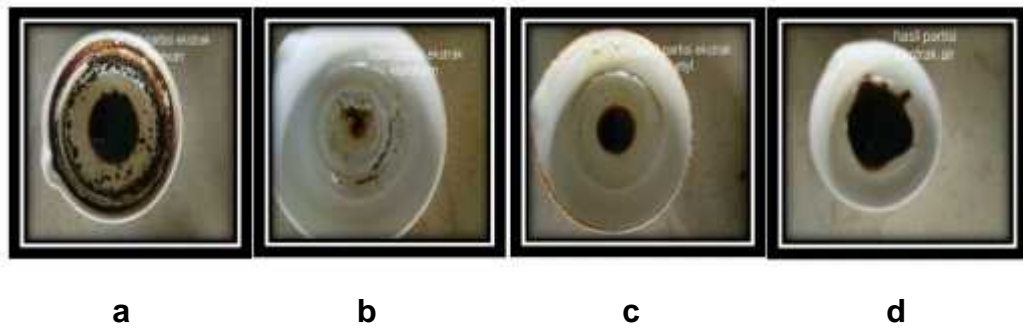


a

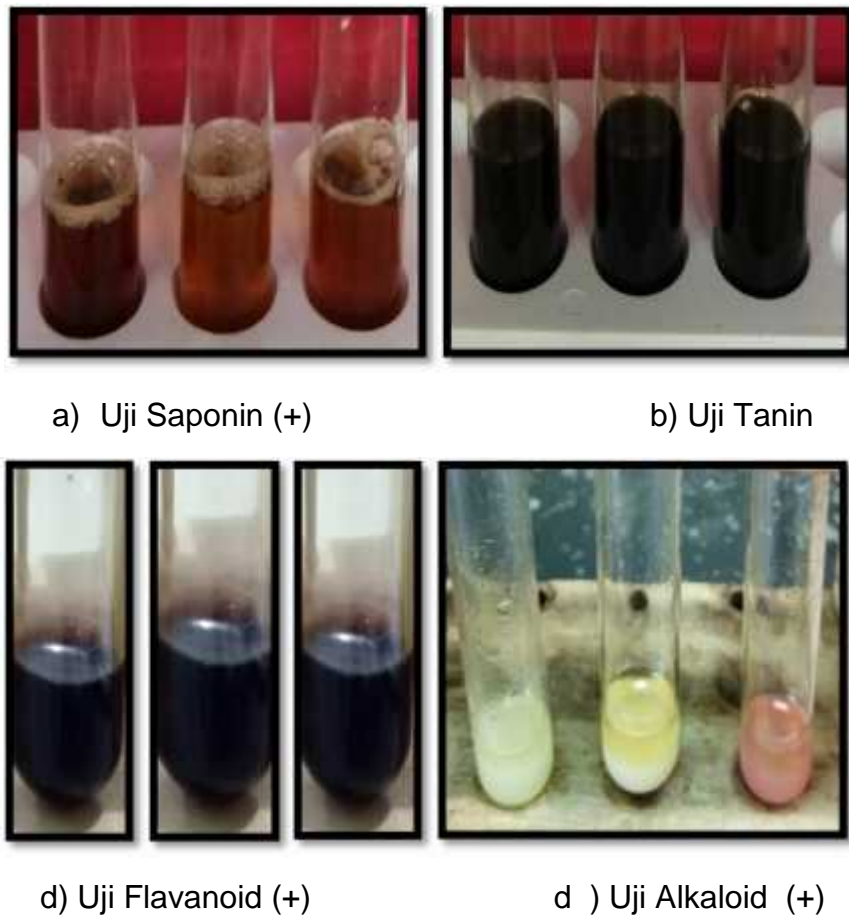
b

c

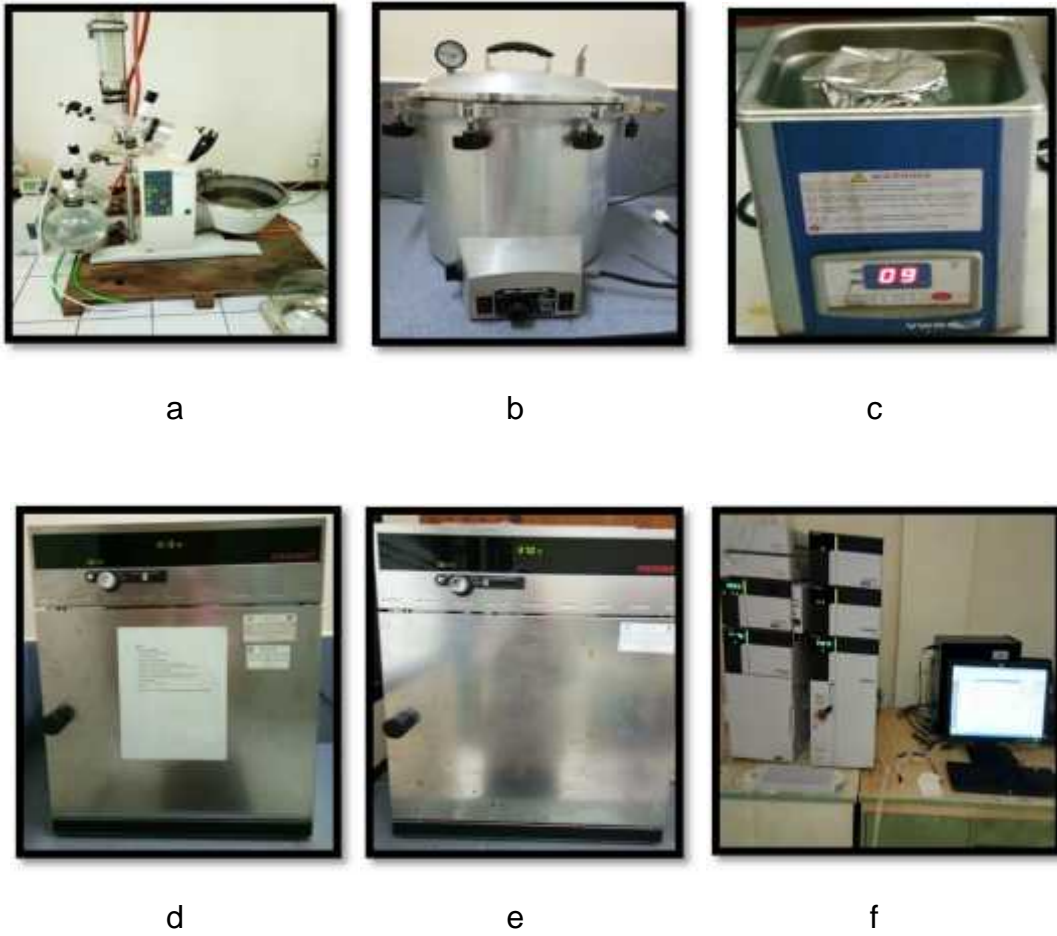
Gambar 31: Ekstrak etanol daun kedondong (*Spondias pinnata* (Lf). Kurz). a) ekstrak pucuk. b) ekstrak tengah. c) ekstrak pangkal



Gambar 32: Fraksi ekstrak kental etanol pucuk daun kedondong (*Spondias pinnata* (Lf). Kurz) : a) fraksi n-heksan. b) fraksi kloroform c) fraksi etil asetat d) fraksi air.



Gambar 33: Identifikasi kandungan kimia a) Uji saponin; b) Uji tanin; c) Uji flavanoid; d) Uji alkaloid



Gambar 34: Foto alat – alat Penelitian: a) Rotapavor, b) Autoklaf, c) Sonikator, d) Inkubator , e) Oven, F) ULFC