

**ISOLASI FRAKSI AKTIF ANTIMIKROBA DAUN KETEPENG CINA
(*Cassia alata* L.) TERHADAP *Escherichia coli***

SKRIPSI

**Diajukan untuk Memenuhi Salah Satu Syarat
Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi (S.Farm.)
Program Studi Ilmu Farmasi**



Oleh :

Yuli Novia

NIM : 008114113

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SANATA DHARMA
YOGYAKARTA
2005**

Persetujuan Skripsi Berjudul

**ISOLASI FRAKSI AKTIF ANTIMIKROBA DAUN KETEPENG CINA
(*Cassia alata* L.) TERHADAP *Escherichia coli***

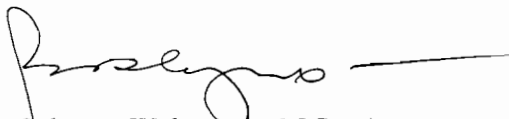
Yang diajukan oleh :

Yuli Novia

NIM : 008114113

Telah disetujui oleh :

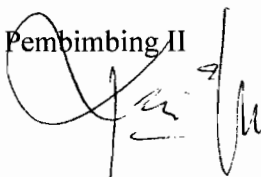
Pembimbing I



Dr. Subagus Wahyuono, M.Sc, Apt.

Tanggal ...20 Desember 2005.....

Pembimbing II



Ign. Y. Kristio Budiasmoro, M.Si

Tanggal ...20 Desember 2005.....

Pengesahan Skripsi
Berjudul

**ISOLASI FRAKSI AKTIF ANTIMIKROBA DAUN KETEPENG CINA
(*Cassia alata* L.) TERHADAP *Escherichia coli***

oleh :

Yuli Novia

NIM : 008114113


Dipertahankan dihadapan Panitia Penguji Skripsi

Fakultas Farmasi

Universitas Sanata Dharma

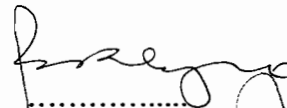
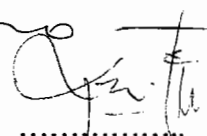
Pada Tanggal :

19 September 2005

Mengetahui
Fakultas Farmasi
Universitas Sanata Dharma
Dekan,

Drs. A. Yuswanto, S.U., Ph.D., Apt.

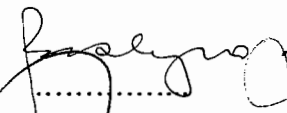

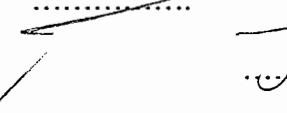

Pembimbing :

1. Dr. Subagus Wahyuono, M.Sc., Apt.
2. Ign. Y. Kristio Budiasmoro, M.Si.


.....

.....

Panitia Penguji :

1. Dr. Subagus Wahyuono, M.Sc., Apt.
2. Ign. Y. Kristio Budiasmoro, M.Si.
3. Drs. A. Yuswanto, S.U., Ph.D., Apt
4. Yohanes Dwiatmaka, M.Si.


.....

.....

.....

.....

*Kejahatan terbesar adalah
ketika kamu tidak menyelesaikan
apa yang telah kamu mulai sebelumnya...*

*Kupersembahkan skripsi ini untuk
Ayah Ibuku, Ma Na dan Bapa,
Ungkapan rasa hormat dan baktiku,
Kedua adikku, Cei dan Nunut,
Dan
Almometerku*

PRAKATA

Sanjung dan puja-puji bagi Allah, hanya kepada-NYA kita menyembah dan kepada-NYA kita memohon pertolongan. Syukur alhamdulillah akhirnya saya dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Isolasi Fraksi Aktif Antimikroba Daun Ketepeng Cina (*Cassia alata* L.) Terhadap *Escherichia coli*”.

Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar kesarjanaan di Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta. Penelitian dan penyusunan skripsi ini tentunya tidak lepas dari bantuan dan dorongan berbagai pihak baik moril maupun materil. Terima kasih banyak kepada mereka yang telah membantu proses penyelesaian skripsi ini.

1. Ayahanda Suherman, Ibunda Liana, Ma Na, dan Bapa atas bimbingan, doa serta dukungannya yang tiada henti baik moril maupun materil.
2. Bapak Dr. Subagus Wahyuono, M.Sc., Apt selaku dosen pembimbing utama yang telah memberikan pengarahan, bimbingan dan saran yang berguna dalam penyelesaian skripsi ini.
3. Bapak Ig. Y. Kristio Budiasmoro, M.Si, selaku dosen pembimbing pendamping yang telah memberikan pengarahan, bimbingan dan saran yang berguna dalam penyelesaian skripsi ini.
4. Bapak Drs. A. Yuswanto, S.U., Ph.D., Apt selaku dosen penguji, atas bimbingan, saran, dan kritik membangun yang telah diberikan.
5. Bapak Yohanes Dwiatmaka, M.Si selaku dosen penguji atas bimbingan, saran, kritik yang telah diberikan.

6. Ibu C.M. Ratna Rini Nastiti, S.Si., Apt., atas saran dan bantuannya selama saya menempuh pendidikan di Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma.
7. Ibu Maria Dwi Budi Jumpowati, S.Si., atas saran dan bimbingannya selama penyelesaian skripsi ini.
8. Segenap staf dan karyawan laboratorium Biologi, mas Wagiran, mas Sarwanto, mas Sigit, mas Andri serta mas Ottok atas bantuannya selama penelitian ini.
9. Cei dan Nunut, adik, teman hidup, terima kasih telah menjadi salah satu motivator saya untuk sampai pada titik ini.
10. Tak ketinggalan satu nama yang harus saya sebut untuk saya ucapkan banyak terima kasih dan banyak cinta: Paulus Dhanar "Vijay" Sugiharto, manusia berbakat yang hadir pada saat yang "tepat". Semua indah pada waktunya.
11. Kawan seperjuangan tergigih, Argina Dwi Aprilia dan Quartanti Riska, terima kasih untuk kerjasama dan semangatnya.
12. Terakhir, sahabat-sahabat saya. Mama, Eka Itul, Ms. Bonbon, Ade Kumpling, Adi Us-us, Mia Miing, Monic Momon, Aji Ponyet, Ayu Uthuk, Nono, terima kasih untuk segala masukannya yang telah memberikan refleksi bagi saya melangkah.

Saya menyadari masih banyak kekurangan dalam penyusunan skripsi ini, oleh karena itu saya mengharapkan kritik dan saran yang bersifat membangun. Semoga skripsi ini bermanfaat.

Penulis

PERNYATAAN KEASLIAN KARYA

Saya menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang saya tulis ini tidak memuat karya atau bagian karya orang lain, kecuali yang telah disebutkan dalam kutipan dan daftar pustaka, sebagaimana layaknya karya ilmiah.

Yogyakarta, September 2005

Penulis



(Yuli Novia)

INTISARI

Secara tradisional ketepeng cina (*Cassia alata* L.) memiliki beragam khasiat, diantaranya digunakan untuk mengobati luka dan penyakit kulit. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui fraksi yang aktif sebagai antimikroba dan kandungan senyawa didalamnya.

Jenis penelitian adalah eksploratif non eksperimental dengan rancangan deskriptif. Ekstraksi bahan menggunakan metode maserasi. Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi adalah kloroform dan metanol. Uji aktivitas antimikroba menggunakan metode difusi dengan cara sumuran. Kontrol negatif yang digunakan DMSO, sedangkan kontrol positifnya kloramfenikol untuk bakteri dan ketokonazol untuk jamur. Fraksi yang aktif diuji kromatografi lapis tipis (KLT) dengan fase diam silika Gel GF 254 dan fase gerak n-heksana: etil asetat (1: 1,5 v/v), dilanjutkan dengan kromatografi lapis tipis preparatif (KLTP) menggunakan fase diam silika Gel GF 254 dan fase gerak n-heksana: etil asetat (1: 1,5 v/v). Identitas senyawa menggunakan KLT dengan fase diam silika Gel GF 254 dan fase gerak n-heksana: etil asetat (1: 2 v/v)

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun ketepeng cina mempunyai aktivitas antimikroba terhadap *Escherichia coli*. Hasil kromatografi lapis tipis (KLT) menunjukkan residu merupakan fraksi yang aktif sebagai antimikroba, dan fraksi tersebut mengandung antrakinin.

Kata kunci : Ketepeng cina, *Escherichia coli*, fraksi aktif antimikroba, antrakinin

ABSTRACT

Traditionally, the leaf of “ketepeng cina” (*Cassia alata* L.) has various medical usage, such as to treat wounds and skin disease. This research aims to isolate the active fraction having antimicrobial activity and identify the corresponding compounds.

The research was an explorative non experimental with the descriptive design. Extraction of the material used the maseration method. The antimicrobial activity was determined by diffusion method with DMSO as negative control and chloramphenicol and ketokonazol as positive control, for bacteria and fungi, respectively active fraction was separated by thin layer chromatography using silica gel GF 254 as stationary phase and n-Hexsan: ethyl acetate (1:1 v/v) as mobile phase, continued with preparative thin layer chromatography with silica gel GF 254 as stationary phase and n-Hexsan: ethyl acetate (1: 1,5 v/v) as mobile phase. Thin layer chromatography was done using mobile phase of n-Hexsan: ethyl acetate (1: 2 v/v) to identify that active fraction.

The result of this research suggested that the methanol extract of ketepeng cina leaves had antimicrobial activity against *Escherichia coli*. Thin layer chromatograph suggested that the active fraction was antraquinon.

Keyword : Ketepeng cina, *Escherichia coli*, active fraction antimicrobial, antraquinon



DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN PEMBIMBING	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iv
PRAKATA	v
HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN KARYA	vii
INTISARI	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Permasalahan.....	2
C. Keaslian Penelitian	3
D. Manfaat Penelitian.....	3
E. Tujuan Penelitian.....	3
BAB II. PENELAAHAN PUSTAKA	4
A. Uraian Tanaman	4

1. Dadap ayam (<i>Erythrina orientalis</i> (L.) Merr.).....	4
2. Johar (<i>Cassia siamea</i> Lamk)	5
3. Ketepeng cina (<i>Cassia alata</i> L.)	5
B. Bakteri	7
1. <i>Staphylococcus aureus</i>	7
2. <i>Escherichia coli</i>	8
C. Fungi	9
D. Antimikroba	10
1. Antibakteri	10
2. Antifungi	11
E. Metode pengujian aktivitas antimikroba	12
1. Metode difusi	13
2. Metode dilusi	13
F. Medium	14
G. Kloramfenikol	15
H. Ketokonazol	15
I. Maserasi	16
J. Kromatografi Lapis Tipis	18
K. Kromatografi Lapis Tipis Preparatif	19
L. Antrakinon	20
M. Keterangan Empiris	21
BAB III. METODOLOGI PENELITIAN.....	22
A. Jenis dan Rancangan Penelitian	22

B. Variabel Penelitian.....	23
1. Variabel utama.....	23
2. Variabel pengacau	23
3. Definisi Operasional	23
C. Bahan	24
D. Alat	25
E. Tata Cara Penelitian.....	26
1. Pengumpulan tanaman	26
2. Determinasi	26
3. Pembuatan serbuk tanaman	26
4. Penyarian serbuk tanaman	26
5. Pengujian aktivitas antimikroba	28
6. Fraksinasi ekstrak metanol	30
7. Isolasi fraksi aktif dengan KLTP	32
8. Uji aktvitas antimikroba isolat	34
9. Uji identitas isolat dengan KLT	34
F. Tata Cara Analisis Hasil.....	35
BAB IV. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	36
A. Determinasi Tanaman.....	36
B. Pengumpulan Sampel Tanaman	36
C. Pengeringan dan Pembuatan Serbuk.....	37
D. Penyarian Tanaman	38
E. Hasil Uji Antimikroba	40

F. Hasil Fraksinasi Ekstrak Metanol Ketepeng Cina	43
G. Uji Aktivitas Antimikroba Hasil Fraksinasi	43
H. Profil KLT Residu Hasil Fraksinasi	44
I. Hasil Uji KLTP	45
J. Uji Antimikroba Isolat Hasil KLTP.....	46
K. Hasil Uji Identitas Isolat	48
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	49
A. Kesimpulan.....	49
B. Saran	49
DAFTAR PUSTAKA.....	50
LAMPIRAN	53
BIOGRAFI	64

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel I. Hasil maserasi serbuk daun tanaman suku <i>Leguminosae</i>	39
Tabel II. Hasil uji antimikroba ekstrak serbuk simplisia dengan konsentrasi 5%.....	41
Tabel III. Purata diameter zona hambat residu dan filtrat ekstrak metanol ketepeng cina hasil sentrifugasi	43
Tabel IV. Hasil KLTP dengan fase diam silika gel GF 254; fase gerak n-Heksan-Etil asetat (1; 1,5 v/v)	46
Tabel V. Purata diameter zona hambat isolat I dan II hasil KLTP	46

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Skema Penyarian Tanaman Suku <i>Leguminosae</i>	27
Gambar 2. Skema Proses Fraksinasi Ekstrak Metanol Ketepeng Cina (<i>Cassia alata</i> L.)	31
Gambar 3. Skema Isolasi Ekstrak Metanol Ketepeng Cina (<i>Cassia alata</i> L.).....	33
Gambar 4. Skema Uji Identitas Isolat dengan KLT	34
Gambar 5. Uji Antimikroba Fraksi Aktif Ekstrak metanol Ketepeng Cina (<i>Cassia alata</i> L.) Terhadap <i>Escherichia coli</i>	47

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat Pengesahan Determinasi Dadap ayam	53
Lampiran 2. Surat Pengesahan Determinasi Johar	54
Lampiran 3. Surat Pengesahan Determinasi Ketepeng cina	55
Lampiran 4. Dadap ayam (<i>Erythrina orientalis</i> (L.) Merr.)	56
Lampiran 5. Johar (<i>Cassia siamea</i> Lamk)	57
Lampiran 6. Ketepeng cina (<i>Cassia alata</i> L.)	58
Lampiran 7. Uji Antimikroba Daun dadapa ayam, Johar, Ketepeng cina	59
Lampiran 8 Uji Kromatografi Lapis Tipis Preparatif dengan fase diam silika gel GF 254 dan fase gerak n-heksan-etil asetat (1: 1,5 v/v)	60
Lampiran 9. Uji Identitas Isolat Secara Kromatografi Lapis Tipis fase diam silika gel GF 254 dan fase gerak n-heksan-etil asetat (1: 1,5 v/v)	61
Lampiran 10. Uji Identitas Isolat Secara Kromatografi Lapis Tipis fase diam silika gel GF 254 dan fase gerak n-heksan-etil asetat (1: 1,5 v/v) dengan pereaksi KOH etanolik 5%.....	63

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Indonesia merupakan salah satu Negara yang kaya akan tanaman yang berkhasiat sebagai obat. Pada umumnya masyarakat Indonesia menggunakan tanaman tersebut sebagai obat tradisional, baik untuk mencegah, mengobati penyakit maupun hanya sekedar untuk memelihara kesehatannya.

Penyakit kulit, demam, dan sakit perut merupakan penyakit yang banyak dijumpai dimasyarakat. Penyakit tersebut antara lain disebabkan oleh bakteri *Staphylococcus aureus* , *Escherichia coli* dan jamur. Jamur yang paling menginfeksi manusia adalah jamur oportunistik. Salah satu agen jamur yang ditemui dengan frekuensi terbesar adalah *Candida albicans* .

Agar peranan obat tradisional khususnya obat dari tumbuhan dapat lebih ditingkatkan, perlu didorong oleh upaya pengenalan, penelitian, pengujian dan pengembangan khasiat serta keamanan suatu tanaman obat, sehingga keberadaannya dapat diterima dikalangan medik (Wijayakusuma, 1992).

Salah satu tanaman obat di Indonesia yang potensial sebagai obat ialah tanaman yang berasal dari suku *Papilionaceae*, antara lain dadap ayam (*Erythrina orientalis* (L.)), johar (*Cassia siameae* Lamk.), ketepeng cina (*Cassia alata* L.). Daun ketepeng cina digunakan sebagai pencahar (laksansia), obat kulit seperti kudis, kurap dan panu, obat sembelit, cacingan, bronkitis dan sariawan, mengandung senyawa-senyawa yang terutama termasuk dalam golongan antrasena seperti antrakinin, antron, diantron dan oksimetil antrakinin

(Syamsuhidayat, 1991; Wijayakusuma dkk, 1991). Daun johar biasa digunakan sebagai antipiretik, untuk mengobati demam, kencing manis, malaria, dan untuk mengobati luka (obat luar). Senyawa yang terkandung didalamnya adalah alkaloid, flavonoid, steroida antrakinon, dan tanin (Soedibyo, 1998). Dadap ayam berfungsi sebagai pelancar ASI, ekspektoran, emenagoga, antipiretik, sakit kulit (obat luar). Sedangkan senyawa yang terkandung didalam dadap ayam adalah resin, fenol, eritrinin, serta flavonoid (Anonim, 1989).

Berdasarkan hal tersebut, tanaman yang termasuk kedalam suku *Papilionaceae* sangatlah menarik untuk diteliti. Pada penelitian pendahuluan, dilakukan pengujian aktivitas antimikroba fraksi kloroform dan fraksi metanol dari daun tanaman suku *Papilionaceae* terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, dan jamur *Candida albicans*, sehingga diperoleh tanaman yang aktif sebagai antimikroba dengan diameter zona hambat paling besar, yaitu ketepeng cina (*Cassia alata* L.) dengan subjek uji *Escherichia coli*. Selanjutnya dilakukan isolasi fraksi aktif antimikroba daun ketepeng cina (*Cassia alata* L.) terhadap *Escherichia coli*.

B. Permasalahan

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan diatas, permasalahan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Fraksi apakah yang aktif sebagai antimikroba dari salah satu tanaman suku *Papilionaceae* yang diuji?
2. Identitas senyawa apakah yang terdapat dalam fraksi yang memiliki aktivitas antimikroba paling baik ?

C. Keaslian Penelitian

Sejauh penelusuran pustaka yang dilakukan oleh peneliti, penelitian dengan judul isolasi fraksi aktif antimikroba daun ketepeng cina (*Cassia alata* L) terhadap *Escherichia coli* belum pernah dilakukan.

D. Manfaat Penelitian

Manfaat yang diharapkan dari penelitian ini meliputi:

1. Manfaat teoritis

Penelitian ini diharapkan dapat menambah pengetahuan yang berguna bagi perkembangan ilmu, khususnya dibidang farmasi dan dapat dijadikan acuan untuk penelitian-penelitian selanjutnya yang berkaitan dengan penggunaan daun ketepeng cina (*Cassia alata* L)

2. Manfaat praktis

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang fraksi yang memiliki aktivitas antimikroba paling baik serta identitas senyawa yang terkandung didalam fraksi tersebut.

E. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui fraksi aktif dari salah satu tanaman suku *Papilionaceae* yang mempunyai aktivitas antimikroba paling baik dan identitas senyawa dari fraksi yang aktif tersebut.

BAB II

PENELAAHAN PUSTAKA

A. Uraian tentang tanaman

1. Dadap ayam (*Erythrina variegata*(L.) Merr.)

Dadap ayam termasuk kedalam suku *Papilionaceae* (*Leguminosae*), marga *Erythrina*, serta berjenis *Erythrina orientalis* (L.) Merr. (Syamsuhidayat & Hutapea, 1991). Tanaman dadap ayam memiliki nama daerah yang berbeda-beda, antara lain Dadap bledung (Sunda); Dadap ayam, Dadap laut, Thentheuk (Jawa); Dadap (Sumatera); Galala hitam, Uken, Ngolola adatataro, Papa auko, Galala kokotu, Lola kohori (Maluku); Dalundung, Deris (Nusa Tenggara) (Anonim, 1986). Nama lain dari dadap ayam adalah *Erythrina variegata* L., *Erythrina indica* Lamk., *Erythrina lithosperma* Bl., *Erythrina spathacea* DC. Sedangkan nama simplisianya adalah *Erythrinae variegatae Folium* (Soedibyo, 1998).

Tanaman berupa pohon, tinggi lebih kurang 25 meter. Batang berkayu, berduri tempel, warna hijau keputihan. Daun majemuk, anak daun tiga, berbentuk bulat telur, panjang 20-30 cm, lebar 4-10 cm, berwarna hijau. Tulang daun menyirip, warna kuning kecoklatan, agak menonjol dari permukaan daun. Bunga majemuk berbentuk tandan, panjang mahkota 8 cm, berbentuk kupu-kupu, berwarna merah. Buah polong, berambut, panjang 10-30 cm, buah muda berwarna hijau setelah tua berwarna coklat (Soedibyo, 1998).

Kandungan kimia didalamnya adalah resin, fenol, eritrinin, serta flavonoid (Anonim, 1986). Dadap ayam biasa digunakan sebagai pelancar ASI, ekspektoran, emenagoga, antipiretik, sakit kulit (obat luar) (Anonim, 1986; Soedibyo, 1998).

2. Johar (*Cassia siamea* Lamk)

Johar termasuk kedalam suku *Caesalpiniceae* (*Leguminosae*), marga *Cassia*, serta nama spesiesnya adalah *Cassia siamea* Lamk (Syamsuhidayat & Hutapea, 1991). Nama daerah tanaman johar di Indonesia dan Jawa yaitu juwar, johar (Heyne, 1987). Di daerah Sumatera dikenal dengan nama johor (Sastrapradja, 1986). Tanaman johar memiliki nama lain yaitu *Cassia florida* Valh dan nama simplisia yaitu *Cassia siameae Folium* (Soedibyo, 1998).

Tanaman herba tahunan, menjalar. Batang bulat, menjalar, beruas-ruas, berlubang, gundul, bercabang, panjang lebih kurang tiga meter, warna hijau. Daun tunggal, berseling, bentuk lanset, ujung runcing, tepi rata, pangkal rompang, panjang 3-15 cm, lebar 1-9 cm, pertulangan menyirip, warna hijau. Bunga tunggal, bentuk terompet, diketiak daun, panjang 3-5 cm, diameter lebih kurang 5 cm, warna ungu. Buah bulat telur, gundul, diameter lebih kurang 1 cm, buah muda berwarna hijau pucat setelah tua berwarna coklat (Soedibyo, 1998).

Kandungan kimia yang terdapat pada tanaman johar antara lain alkaloid, flavonoid, steroida, antraknon, dan tanin. Daun johar biasa digunakan sebagai antipiretik, untuk mengobati demam, kencing manis, malaria, dan untuk mengobati luka (obat luar) (Soedibyo, 1998).

3. Ketepeng cina (*Cassia alata* L.)

Ketepeng cina termasuk kedalam suku *Caesalpiniceae* (*Leguminosae*), marga *Cassia* dan berjenis *Cassia alata* L. Beberapa nama daerah yang dikenal antara lain daun kupang, daun kurap, ketepeng, kupang-kupang, gelenggang, ura'kap (Sumatera); ketepeng badak, kimanila, ketepeng kebo, ketepeng cina,

acon-aconan (Jawa); saya mara, tabankun, hanya mara, kupang-kupang (Maluku) (Heyne, 1987; Syamsuhidayat, 1991). Nama simplisia dari daun ketepeng cina adalah *Cassia alatae Folium* (Soedibyo, 1998)

Cassia alata termasuk perdu besar yang tingginya mencapai 5 meter. Percabangan banyak, daun besar-besar berupa daun majemuk menyirip genap, baunya agak langau. Anak daun kaku, bentuk jarang sampai bundar telur sungsang berpasangan 5-12 garis, panjang anak daun 3-5 cm, lebar 2,5-9 cm, ujung daun tumpul, pangkal daun miring, tepi daun rata, tangkai anak daun lebih kurang 2 cm. Bunga tersusun dalam tandan bertangkai panjang, tegak, letaknya diujung-ujung cabang. Mahkota bunga berwarna kuning terang. Buah polong, jepung, hitam, bersayap pada kedua sisinya dengan panjang 10-20 cm dan lebar 12-15 mm yang pecah bila sudah masak, berisi 50-70 biji (Heyne, 1987; Syamsuhidayat, 1991).

Daun tanaman ini mengandung senyawa-senyawa yang terutama termasuk dalam golongan antrasena seperti antrakinin, antron, diantron dan oksimetil antrakinin yang terdapat dalam bentuk bebas, glikosida maupun bentuk polimernya (Syamsuhidayat, 1991; Wijayakusuma dkk, 1991).

Daun ketepeng cina digunakan sebagai pencahar (laksansia), obat kulit seperti kudis, kurap and panu, obat sembelit, cacingan, bronkitis dan sariawan (Wijayakusuma, 1996). Disamping sebagai obat, daun tanaman ini digunakan juga sebagai bumbu masak atau lauk pauk (Heyne, 1987).

B. Bakteri

Bakteri pada umumnya mempunyai ukuran sel 0,5-1,0 μm kali 2,0-5,0 μm , terdiri dari tiga bentuk dasar yaitu: (1) bentuk bulat atau kokus, (2) bentuk batang atau basilus (jamak: basil), dan (3) bentuk spiral. Bakteri ada yang berukuran besar dengan diameter sekitar 5 μm , berukuran sedang seperti bakteri penyebab tifus dan disentri yang mempunyai ukuran 0.5-1 μm kali 2-3 μm , dan berukuran sangat kecil seperti mikoplasma yang mempunyai ukuran diameter 0,1-0,3 μm .

Bakteri tumbuh dengan cara pembelahan biner, yang berarti satu sel membelah menjadi dua sel. Bakteri-bakteri membiak dengan cara memanjangkan sel diikuti dengan pembelahan sel yang membesar menjadi dua sel. pH optimum untuk pertumbuhan bakteri terletak antara 6,5-7,5 (Pelczar, 1986).

Struktur sel bakteri antara lain terdiri dari fimbria dan pilus, kapsul atau lapisan lendir, dinding sel, membran sitoplasma, sitoplasma, kromosom bakteri, ribosom, mesosom (Volk & Wheeler, 1988).

Pada penelitian ini digunakan dua macam bakteri yaitu *Staphylococcus aureus* yang mewakili bakteri gram positif dan *Escherichia coli* yang mewakili bakteri gram negatif.

1. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus termasuk ke dalam suku *Micrococcaceae*, bermarga *Staphylococcus*, dan nama spesiesnya adalah *Staphylococcus aureus* (Salle, 1961).

Staphylococcus adalah bakteri gram positif berbentuk bulat biasanya tersusun dalam rangkaian tak beraturan seperti anggur. Bakteri ini mudah tumbuh

pada berbagai perbenihan dan mempunyai metabolisme aktif, meragikan karbohidrat serta menghasilkan pigmen yang bervariasi. *Staphylococcus* tidak bergerak dan tidak membentuk spora (Jawetz, 1996).

Staphylococcus mudah tumbuh pada kebanyakan perbenihan bakteri dalam keadaan aerob atau mikroaerofilik. Koloni pada pembedihan padat berbentuk bundar, halus menonjol dan berkilau. *Staphylococcus aureus* membentuk koloni berwarna abu-abu sampai kuning emas tua (Jawetz, 1996).

2. *Escherichia coli*

Escherichia coli adalah kuman oportunistik yang banyak ditemukan didalam usus besar manusia sebagai flora normal, yang berukuran $0,4-0,7 \mu\text{m} \times 1,4 \mu\text{m}$ (Anonim, 1994). *Escherichia coli* termasuk kedalam suku *Enterobacteriaceae*, marga *Escherichia*, spesies *Escherichia coli* (Salle, 1961).

Escherichia coli termasuk bakteri gram negatif berbentuk batang pendek, pada umumnya tidak berkapsula dan bergerak aktif. *Escherichia coli* membentuk koloni yang bundar, cembung, halus dan tepi yang nyata (Jawetz, 1986).

Eubacteriaceae adalah kelompok besar batang gram negatif yang heterogen, yang habitat alaminya adalah saluran usus manusia dan hewan. Bakteri ini menjadi patogen apabila berada diluar usus. Tempat yang paling sering terkena infeksi adalah saluran kemih, saluran empedu, dan tempat-tempat lain dirongga perut. (Jawetz, 1986).

C. Fungi

Fungi tidak seperti bakteri, fungi adalah organisme eukariotik sehingga beberapa target spesifik yang terdapat dalam bakteri tidak terdapat pada jamur patogen (Franklin dan Snow, 1989).

Jamur tersusun dari benang-benang sel panjang yang dihubungkan bersama dari ujung ke ujung. Benang-benang itu disebut hifa. Ukuran sel yang menyusun hifa berbeda satu sama lain. Bertahun-tahun fungi dibagi menjadi empat kelas utama: *Phycomycetes*, *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* dan *Deuteromycetes* (Volk & Wheeler, 1988).

Pada penelitian ini digunakan satu jamur, yaitu *Candida albicans*. *Candida albicans* adalah jamur berbentuk lonjong, bertunas, yang menghasilkan pseudomiselium baik dalam biakan maupun dalam jaringan dan eksudat. Jamur ini termasuk ke dalam suku *Moniliaceae*, bermarga *Candida*, dan nama spesiesnya adalah *Candida albicans*. *Candida* ini adalah anggota flora normal selaput lendir saluran pernafasan, saluran pencernaan, dan genitalia wanita. Pada tempat-tempat ini, jamur dapat menjadi dominan dan dihubungkan dengan keadaan patogen. Kadang-kadang jamur ini menyebabkan penyakit sistemik progresif pada penderita yang lemah atau kekebalannya tertekan (Jawetz dkk, 1996).

Morfologi *Candida albicans* tampak sebagai ragi lonjong bertunas, gram positif, berukuran 2-3 x 4,6 μm , dan sel-sel bertunas, gram positif yang memanjang menyerupai hifa. Pada agar *Saurooud* yang dieramkan pada suhu kamar, berbentuk koloni-koloni berwarna krem yang mempunyai bau seperti ragi

(Jawetz dkk, 1996). *Candida albicans* dapat menyebabkan infeksi yang disebut kandidiasis. Gejala umum infeksi yaitu kedinginan, panas tinggi, tekanan darah rendah, lemah, kadang-kadang ruam. Penderita juga mengalami gejala lainnya tergantung dari lokasi infeksi, misalnya, infeksi pada paru-paru akan menyebabkan demam dan batuk, atau bahkan batuk darah.

D. Antimikroba

Antimikroba yang ideal menunjukkan toksisitas yang selektif. Hal ini mengandung arti bahwa obat berbahaya bagi parasit tetapi tidak berbahaya bagi pasien. Toksisitas selektif mungkin fungsi yang dibutuhkan reseptor yang spesifik untuk serangan obat atau hal ini mungkin tergantung dari proses –proses dasar biokimia dalam sel parasit dan tidak berpengaruh pada sel penderita. Pola penghambatan dapat digolongkan menjadi empat golongan, yaitu penghambatan pada fungsi serta biosintesis membran sel, penghambatan pada sintesis protein dan asam nukleat, penghambatan biosintesis dinding sel, mengganggu suplai energi untuk metabolisme (Jawetz, 1986).

1. Antibakteri

Senyawa antibakteri adalah suatu zat atau senyawa kimia yang dapat menghambat atau membunuh mikroorganisme yaitu bakteri. Senyawa antibakteri yang ideal memiliki toksisitas selektif, artinya obat hanya membahayakan parasit tanpa membahayakan sel inangnya.

Berdasarkan sifat toksisitas selektif, ada bakteri yang bersifat menghambat pertumbuhan bakteri (*bacteriostatik*), dan ada yang bersifat membunuh bakteri

(*bacteriosida*). Kadar minimal yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan bakteri atau membunuhnya, masing-masing dikenal sebagai Kadar Hambat Minimal (KHM) dan Kadar Bunuh Minimal (KBM). Antibakteri tertentu aktifitasnya dapat meningkat dari bakteriostatik menjadi bakteriosida bila kadar antibakterinya meningkat (Anonim, 1995).

2. Antifungi

Antifungi adalah obat untuk membasmi fungi. Istilah untuk antifungi mempunyai dua pengertian, yaitu fungisida dan fungistatik. Fungisida didefinisikan sebagai senyawa yang dapat membunuh fungi, sedangkan fungistatik dapat menghambat pertumbuhan fungi tanpa mematikannya.

Aksi agen antifungus dapat merusak komposisi membran, menimbulkan efek pada nukleus atau menyerang dinding sel fungus (Franklin dan Snow, 1989). Beberapa kelompok bahan efektif sebagai agen antifungus dengan adanya aksi biosintesis ergosterol. Ergosterol mempunyai fungsi yang sama di dalam membran fungi tetapi pada mamalia membran ini digantikan oleh kolesterol. Kelompok bahan yang biasa digunakan agen antifungus adalah yang menghambat C-14 dimetilasi. Secara umum semuanya mengarah pada antifungus azole yang berisi nitrogen heterosiklik. Bahan-bahan yang terdiri dari azole juga digunakan dalam pertanian untuk menanggulangi bermacam hama jamur pada tanaman, sebagai contoh diklobutrasol (Franklin dan Snow, 1989).

Antifungus yang menghambat biosintesis ergosterol menunjukkan selektivitas untuk sistem fungal. Antifungus azole seratus kali lebih potensial

menyerang demetilasi lanosterol dalam fungi daripada merespon reaksi pada mamalia (Franklin dan Snow, 1989).

E. Metode Pengujian Aktivitas Antimikroba

Potensi antimikroba dapat ditetapkan dengan berbagai cara antara lain dengan metode difusi agar menggunakan cakram kertas atau sumuran sebagai tempat senyawa antimikroba, metode dilusi cair dan padat, dan turbidimetri cair (cara tabur).

I. Metode difusi

Cara ini berdasarkan kemampuan obat berdifusi dalam media tempat kuman yang dapat berkembang biak secara optimal. Cakram yang mengandung antibiotik diletakkan di atas agar atau bila dengan metode sumuran, antibiotik dimasukkan ke dalam sumuran. Besarnya daerah difusi tergantung dengan daerah pertumbuhan atau hambatan kuman uji dan sebanding dengan kadar obat yang diberikan. Dalam pelaksanaannya ada tiga cara, yaitu:

a. Cara Kirby Bower

Cara ini dilakukan dengan cara menggoreskan suspensi bakteri tertentu, umumnya 10^6 Colony Forming Unit (CFU) per-ml pada permukaan media hingga merata. Kertas disk yang mengandung antibiotik diletakkan diatas media lalu diinkubasi pada suhu 37^0 C selama 18-24 jam, setelah itu baca hasilnya. Cara ini dikenal 2 macam zona, yaitu:

- 1) Zona radikal adalah suatu daerah di sekitar disk yang sama sekali tidak ditemukan adanya pertumbuhan bakteri.

2) Zona irradikal adalah suatu daerah di sekitar disk yang menunjukkan pertumbuhan bakteri yang dihambat oleh antibiotik tersebut tetapi tidak dimatikan (Hugo & Russel, 1987; Anonim, 1992).

b. Cara sumuran

Penyiapan dilakukan seperti cara *Kirby Bower*. Setelah biakan siap, dibuat sumuran dengan diameter tertentu dan tegak lurus terhadap permukaan media. Larutan obat diteteskan ke dalam sumuran, kemudian diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 18-24 jam, setelah itu baca hasilnya seperti cara *Kirby Bower*.

c. Cara *pour plate*

Mula-mula 1 ml suspensi bakteri dicampur dengan 4 ml agar base 1,5 % pada temperature 50⁰C hingga homogen, kemudian dituang diatas media *Muller Hinton Agar* (MHA) dan biarkan membeku. Disk antibiotik diletakkan diatasnya, kemudian diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 18-24 jam. Hasilnya dibaca seperti cara *Kirby Bower* (Trihendrokesowo, 1986).

II. Metode dilusi

Obat diencerkan sehingga diperoleh beberapa konsentrasi. Pada dilusi cair, masing-masing konsentrasi larutan uji ditambahkan suspensi kuman ke dalam media, sedangkan pada dilusi padat tiap konsentrasi obat dicampur ke dalam media agar, setelah menjadi padat, baru ditanami kuman.

F. Medium

Menumbuhkan suatu mikroorganisme dibutuhkan suatu substrat makanan yang biasa disebut media, yang mengandung unsur-unsur makanan yang dibutuhkan oleh jasad tersebut. Unsur-unsur makanan tersebut dapat berupa garam-garam anorganik dan senyawa-senyawa organik seperti protein, pepton, asam-asam amino, dan vitamin-vitamin yang diperlukan untuk pertumbuhan (Jawets *et al.*, 1996).

Media yang digunakan untuk menumbuhkan mikroba terdapat dalam bentuk padat, semi padat dan cair. Media padat diperoleh dengan menambahkan agar. Dalam laboraorium, sterilisasi media menggunakan autoklaf yang menggunakan tekanan yang disebabkan uap air, sehingga suhu dapat mencapai 121°C (Lay, 1994).

Media sendiri sebelum digunakan harus dalam keadaan steril, artinya tidak ditumbuhi oleh mikroba lain. Agar mikroba dapat tumbuh dan berkembang baik didalam media, diperlukan persyaratan tertentu, yaitu:

1. Di dalam media harus terkandung semua unsur hara yang diperlukan untuk pertumbuhan dan perkembangbiakan mikroba.
2. Media harus mempunyai tekanan osmosis, tekanan permukaan, dan pH yang sesuai dengan kebutuhan mikroba.
3. Media harus dalam keadaan steril, artinya sebelum ditanami mikroba yang dimaksud, tidak ditumbuhi mikroba lain yang tidak diharapkan (Unus, 1985).

G. Kloramfenikol

Semula diperoleh dari sejenis *Streptomyces* (1947), tetapi kemudian dibuat secara sintesis. Antibiotikum broadspectrum ini berkhasiat terhadap hampir semua kuman Gram-positif dan sejumlah kuman Gram-negatif, juga terhadap *spirokhaeta*, *Chlamydia trachomatis* dan *Mycoplasma* (Tan Hoan Tjay dan Rahardja, 2002).

Kloramfenikol berupa hablur halus berbentuk jarum atau lempeng memanjang, putih hingga putih kelabu atau putih kekuningan, larutan praktis netral terhadap lakmus P. Stabil dalam larutan netral atau larutan agak asam. Kloramfenikol sukar larut dalam air, mudah larut dalam etanol, dalam propilen glikol, dalam aseton dan dalam etilasetat (Anonim, 1995). Khasiatnya bersifat bakteristatis *Enterobacter* dan *Staphylococcus aureus* berdasarkan perintangannya polipeptida kuman.

H. Ketokonazol

Turunan imidazol yang mempunyai aktivitas antijamur baik sistemik maupun non sistemik, efektif terhadap *Candida*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, *H. capsulatum*, *B. dermatitis*, *Aspergillus* dan *Sporohrix sp* (Anonim, 1995). Ketokonazol dengan konsentrasi 0,01 µg/ml atau 10 µg/ml sudah dapat menghambat pertumbuhan *Candida albicans*.

Ketokonazol merupakan antijamur sistemik per oral yang diserap baik melalui saluran cerna dan menghasilkan kadar plasma yang cukup untuk menekan aktivitas berbagai jenis jamur. Penyerapan melalui saluran cerna akan berkurang pada penderita dengan pH lambung yang tinggi, pada pemberian bersama

antagonis-H₂ atau bersama antasida. Pengaruh makanan tidak terlalu nyata terhadap penyerapan ketokonazol. Distribusi ketokonazol setelah diserap belum banyak diketahui (Anonim, 1995).

Ketokonazol berupa serbuk putih. Praktis tidak larut dalam air, sedikit larut dalam alkohol, larut dalam metal alkohol, sangat larut dalam metal klorida (Anonim, 1996).

I. Maserasi

Penyarian adalah kegiatan penarikan zat yang dapat larut dengan pelarut cair. Simplisia yang disari mengandung zat aktif yang dapat larut dan zat yang tidak larut seperti serat, karbohidrat, protein dan lain-lain (Anonim, 1986).

Faktor yang mempengaruhi kecepatan penyarian adalah kecepatan difusi zat yang larut melalui lapisan-lapisan batas antara cairan penyari dengan bahan yang mengandung zat tersebut (Anonim, 1986).

Proses penyarian dapat dipisahkan menjadi pembuatan serbuk, pembasahan, penyarian dan pemekatan. Secara umum penyarian dapat dibedakan menjadi infundasi, maserasi, perkolasi dan destilasi uap (Anonim, 1986).

Maserasi adalah proses pengestrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur kamar. Secara teknologi termasuk ekstraksi dengan prinsip metode pencapaian konsentrasi pada keseimbangan. Maserasi kinetik berarti dilakukan pengadukan yang kontinyu. Remaserasi berarti dilakukan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserasi pertama, dan seterusnya (Anonim, 2000).

Maserasi merupakan penyarian yang sederhana, yang dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari. Cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk kerongga sel yang mengandung zat aktif, zat aktif akan larut karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan di dalam sel dan di luar sel (Anonim, 1986).

Penyarian dipengaruhi oleh derajat kehalusan serbuk dan perbedaan konsentrasi yang terdapat mulai dari pusat butir serbuk simplisia sampai kepermukaannya, maupun pada perbedaan konsentrasi yang terdapat batas, sehingga suatu titik akan dicapai oleh zat-zat yang tersari jika ada daya dorong yang cukup untuk melakukan pemindahan massa (Anonim, 1986).

Cairan penyari yang baik harus memenuhi kriteria sebagai berikut:

1. Murah dan mudah diperoleh
2. Stabil secara fisika dan kimia
3. Bereaksi netral
4. Tidak mudah menguap dan tidak mudah terbakar
5. Selektif yaitu hanya menarik zat berkhasiat yang dikehendaki
6. Tidak mempengaruhi zat berkhasiat
7. Diperbolehkan oleh peraturan

(Anonim, 1986)

J. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis ialah metode pemisahan fisikokimia. Pada kromatografi lapis tipis ini menggunakan dua macam fase yaitu fase diam dan fase gerak. Fase diam atau larutan penjerap yang umumnya dipakai ialah silika gel, aluminium oksida, *kieselgur*, selulosa dan turunannya, dan poliamida. Fase diam ini merupakan suatu lapisan berpori dan akan menghasilkan pemisahan pada pelat. Fase gerak atau disebut juga pelarut pengembang ialah medium angkut dan terdiri atas satu atau beberapa pelarut, yang bergerak dalam fase diam karena adanya gaya kapiler (Stahl, 1985).

Prinsip kerja KLT berupa lapisan yang memisah, yang terdiri atas bahan berbutir-butir atau fase diam ditempatkan pada penyangga berupa pelat gelas, logam, atau lapisan yang cocok. Campuran yang akan dipisah berupa larutan yang ditotolkan berupa bercak atau pita, setelah pelat ditaruh di dalam bejana tertutup rapat yang berisi larutan pengembang atau fase gerak yang cocok, pemisahan terjadi selama perambatan kapiler atau pengembangan, selanjutnya senyawa yang tidak berwarna harus ditampakkan atau dideteksi dengan lampu UV atau dengan pereaksi semprot (Stahl, 1985).

Jarak pengembangan senyawa pada kromatogram, yaitu jarak antara garis awal dan garis depan yang besarnya dinyatakan dengan angka Rf atau hRf (Stahl, 1985).

$$R_f = \frac{\text{Jarak titik pusat bercak dari titik awal}}{\text{Jarak pengembangan}}$$

Untuk mendeteksi senyawa tidak berwarna pada kromatografi, cara yang paling sederhana adalah senyawa menunjukkan penyerap dibawah ultra violet (UV) gelombang pendek (254 nm) atau UV gelombang panjang (365 nm). Jika kedua cara itu dapat dideteksi, harus dicoba dengan reaksi kimia, tanpa pemanasan, kemudian bila perlu dipanaskan (Stahl, 1985). Keuntungan dari KLT adalah peralatan yang sedikit, murah, sederhana, waktu analisis cepat dan menghasilkan daya pisah cukup baik.

K. Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP)

Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP) merupakan metode pemisahan yang memakai peralatan yang paling dasar.

KLT preparatif dilakukan dengan menggunakan lapisan tebal (sampai 1 mm) sebagai pengganti lapisan penjerap yang tipis (0,10-0,25 mm). Kandungan yang sudah dipisah dapat diperoleh kembali dengan cara mengerok penjerap di tempat yang sesuai pada pelat yang telah dikembangkan, lalu serbuk dielus dengan pelarut seperti eter, dan akhirnya disentrifugase untuk menghilangkan penjerap (Harborne, 1987).

Ukuran pelat kromatografi biasanya 20 x 20 cm. Penjerap yang paling umum adalah silika gel dan dipakai untuk pemisahan campuran senyawa lipofil maupun senyawa hidrofil. Cuplikan dilarutkan dalam sedikit pelarut sebelum ditotolkan pada pelat kromatografi lapis tipis preparatif membentuk pita. Untuk pita yang terlalu lebar, dapat dilakukan pemekatan dengan cara pengembangan

memakai pelarut polar sampai kira-kira 2 cm diatas tempat penotolan. Kemudian pelat dikeringkan dan dielusi dengan pelarut yang diinginkan (Stahl, 1969).

Pengembangan pelat kromatografi lapis tipis preparatif biasanya dilakukan dengan bejana kaca yang dapat menampung beberapa pelat. Bejana dijaga tetap jenuh dengan pelarut pengembang dengan bantuan sehelai kertas saring yang tercelup dalam pengembang. Jika pemisahan secara kromatografi lapis tipis preparatif telah dicapai, pelat dikeringkan dan kemudian dimasukkan lagi ke dalam bejana (Hostettmann, 1995).

L. Antrakininon

Golongan kinon terbesar terdiri atas antrakininon. Beberapa antrakininon merupakan zat warna penting dan yang lainnya sebagai pencahar. Kebanyakan antrakininon dari tumbuhan tingkat tinggi dihidroksilasi pada C-1 meskipun antrakininon sendiri dilaporkan terdapat dalam berbagai ekstrak tanin tumbuhan dan 2-metil antrakininon. Antrakininon terhidroksilasi barangkali tidak sering terdapat dalam tumbuhan secara bebas, tetapi sebagai glikosida. Semua antrakininon berupa senyawa kristal bertitik leleh tinggi, larut dalam pelarut organik biasa. Senyawa ini biasanya berwarna merah, tetapi yang lainnya berwarna kuning sampai coklat. Mereka larut dalam larutan basa dengan membentuk warna violet merah (Robinson, 1995).

Banyak antrakinon yang terdapat sebagai glikosida dengan bagian gula terikat dengan salah satu gugus hidroksil fenolik. Dalam banyak kasus tampaknya aglikon glikosida asli berbentuk antrakinon reduksi yang dikenal sebagai antron. Gula dalam glikosida tereduksi ini dapat terikat seperti biasanya dengan oksigen fenol pada cincin luar atau dapat juga terikat pada C-9 bentuk fenol antron dan antranol. Hidrolisis oleh enzim (atau secara kimia) glikosida C-9 antranol diikuti oleh oksidasi antron menjadi antrakinon jika ada oksigen. Jika gula terikat pada posisi lain glikosida antron dapat dioksidasi langsung menjadi glikosida antrakinon (Robinson, 1995).

M. Keterangan Empiris

Untuk mengetahui fraksi yang aktif sebagai antimikroba dari daun ketepeng cina (*Cassia alata* L.) dan senyawa yang terkandung di dalamnya

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Jenis dan Rancangan Penelitian

1. Jenis penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah eksploratif non eksperimental.

2. Rancangan penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan tahapan sebagai berikut:

- a. Pengumpulan, pembersihan, pengeringan, pembuatan serbuk daun ketepeng cina, daun johar dan daun dadap ayam
- b. Determinasi tanaman
- c. Pembuatan serbuk tanaman
- d. Penyarian daun dadap ayam, johar dan daun ketepeng cina
- e. Pengujian aktivitas antimikroba tanaman dadap ayam, johar, dan ketepeng cina.
- f. Fraksinasi ekstrak metanol ketepeng cina (*Cassia alata*. L)
- g. Isolasi fraksi aktif ekstrak metanol ketepeng cina dengan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP)
- h. Uji aktivitas antimikroba isolat
- i. Uji identitas isolat dengan Kromatografi lapis tipis (KLT)
- j. Analisa hasil

B. Variabel dan Definisi Operasional

1. Variabel utama

a. Variabel bebas

Fraksi aktif antimikroba, pelarut untuk ekstraksi, fase gerak untuk Kromatografi Lapis Tipis (KLT), fase gerak untuk Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP).

b. Variabel tergantung

Bercak hasil kromatografi, harga Rf, dan warna bercak, diameter zona hambat.

2. Variabel pengacau

Variabel pengacau pada penelitian ini adalah varietas tanaman, lingkungan tempat tumbuh tanaman, dan waktu pemanenan.

3. Definisi operasional

- a. Isolasi adalah prosedur pemisahan senyawa aktif antimikroba dari ekstrak metanol daun ketepeng cina (*Cassia alata* L.)
- b. Identitas senyawa aktif adalah penentuan senyawa dari fraksi yang mempunyai aktivitas antimikroba, yang ditentukan dengan cara kromatografi lapis tipis.
- c. Fraksi aktif adalah fraksi yang mempunyai aktivitas antimikroba paling besar dalam menghambat atau membunuh mikroba.
- d. Fraksi kloroform adalah semua zat yang terkandung dalam daun ketepeng cina (*Cassia alata* L.) yang tersari dalam kloroform
- e. Fraksi metanol adalah semua zat yang terkandung dalam daun ketepeng cina (*Cassia alata* L.) yang tersari dalam metanol

f. Aktivitas antimikroba adalah kemampuan suatu zat atau bahan untuk menghambat atau membunuh pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*, bakteri *Escherichia coli* dan jamur *Candida albicans*.

C. Bahan

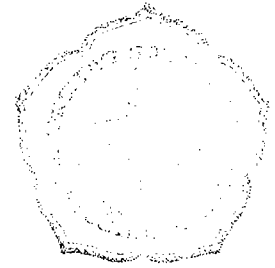
Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Daun ketepeng cina (*Cassia alata* L.), daun johar (*Cassia siamea* Lamk.), daun dadap ayam (*Erythrina variegata* L.).
2. Bakteri *Staphylococcus aureus*, bakteri *Escherichia coli* serta jamur *Candida albicans*.
3. *Trypticase Soya Agar* (Oxoid), *Sabouroud Liquid Medium* (Oxoid), *Nutrien Broth* (Oxoid).
4. Aquadestilata steril
5. DMSO
6. Metanol (Brataco)
7. Kloroform (Brataco)
8. Kloramfenikol
9. Ketokonazol
10. Silika Gel GF 254
11. N-heksan : etil asetat
12. Kertas saring
13. Amonia

D. Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini, yaitu:

1. *Platform Shaker* (Innova™ 2100)
2. *Rotaevaporator* (Janke & Kunkel, Ika-Labotechnik, RV05-ST).
3. *Waterbath* (Mermmert)
4. *Inkubator* (Mermmert, type BE 400, GmbH+CoKG-D91126, Swahaban FRG, Germany).
5. *Laminar Air Flow* (LAF)
6. *Autoklaf* (Model KT-40, ALP Co, Ltd, Hamurashi Tokyo, Japan).
7. Lemari pendingin (Sharp, Japan)
8. Kompor listrik
9. Jarum ose, pencetak sumuran dengan diameter sebesar 8 mm, mikropipet, pipet ukur, cawan Petri, pemanas bunsen.
10. Lempeng Kromatografi Lapis Tipis (KLT)
11. Alat-alat gelas (Pyrex), neraca analitik, lampu ultra violet, *chamber*



E. Tata Cara Penelitian

1. Pengumpulan daun dadap ayam, daun johar, daun ketepeng cina

Pengumpulan daun dadap ayam, daun johar, daun ketepeng cina dilakukan pada bulan Maret 2004. Daun ketepeng cina dan daun dadap ayam dikumpulkan dari kebun obat Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma, sedangkan daun Johar dikumpulkan dari daerah Mrican, Yogyakarta.

2. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma Yogyakarta.

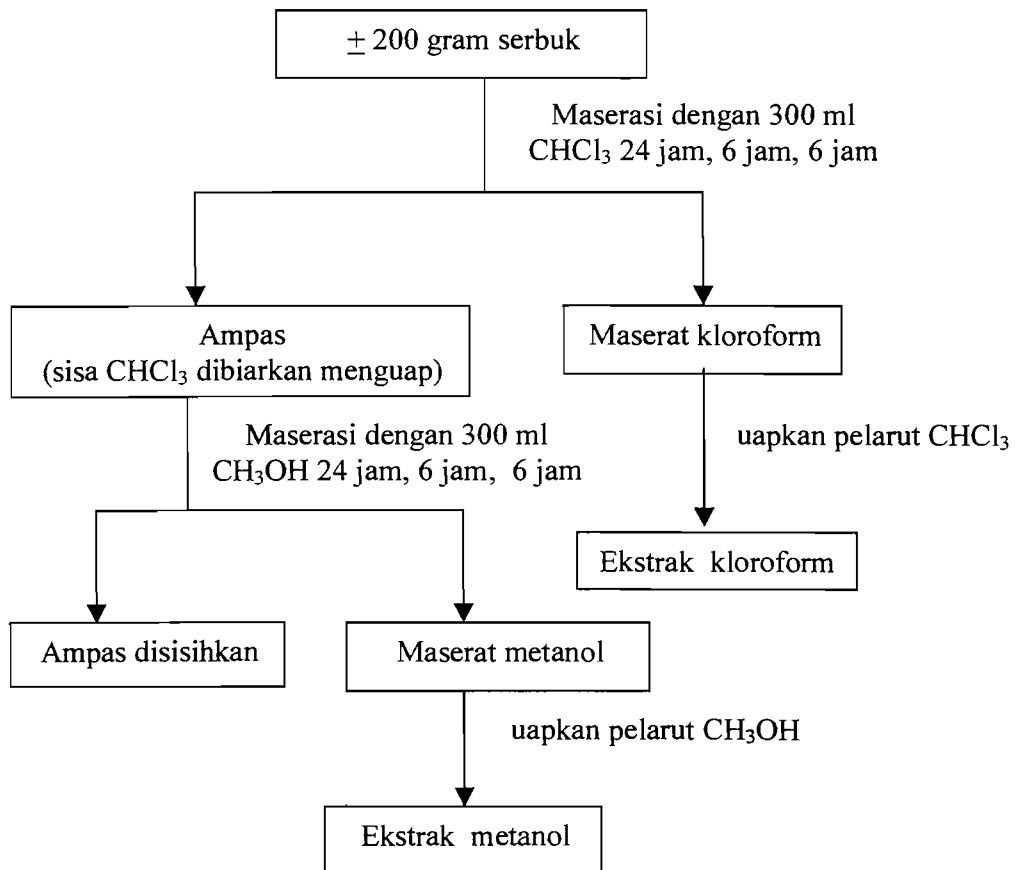
3. Pembuatan serbuk daun dadap ayam, daun johar, daun ketepeng cina

Daun segar yang telah dikumpulkan dicuci menggunakan air mengalir hingga bersih untuk menghilangkan kotoran-kotoran yang menempel pada permukaan daun, kemudian diangin-anginkan hingga kering. Semua daun yang telah dibersihkan dari kotoran ditutup dengan kain hitam dan dikeringkan dibawah sinar matahari. Masing-masing simplisia daun diblender hingga menjadi serbuk.

4. Penyarian serbuk daun ketepeng cina, daun johar, daun dadap ayam.

Masing-masing serbuk ditimbang \pm 200 gram, kemudian dimaserasi dengan kloroform. Maserasi dilakukan dengan tiga kali replikasi. Hasil maserasi disaring dan didapat maserat kloroform, kemudian diuapkan cairan penyarinya hingga kental. Ampas diangin-anginkan hingga sisa kloroform menguap semua, kemudian dilanjutkan maserasi menggunakan metanol dengan tiga kali replikasi. Hasil maserasi disaring dan didapat maserat metanol, kemudian diuapkan cairan

penyarinya hingga didapat ekstrak kental. Selanjutnya digunakan untuk diujikan pada mikroba dan untuk uji KLT.



Gambar 1. Skema penyarian tanaman suku *Papilionaceae*

5. Pengujian Aktivitas Antimikroba

Pengujian aktivitas antimikroba menggunakan metode difusi dengan cara sumuran. Alat dan bahan yang akan digunakan disterilkan terlebih dahulu dan pengerjaannya dilakukan secara aseptis didalam *Laminar Air Flow* (LAF).

a. Pembuatan media

Sebanyak 40 gram *Trypticase Soya Agar*, 13 gram *Nutrien Broth*, dan 30 gram *Sabouroud Diluted Medium* ditimbang dan masing-masing dilarutkan kedalam 1 L aquadest. Masing-masing serbuk dipanaskan sampai mendidih dan jernih, ditutup dengan kapas dan plastik, kemudian disterilkan pada suhu 121 °C dan tekanan 1 atm selama 15 menit.

Nutrient Broth digunakan untuk suspensi bakteri dan *Sabouroud Diluted Medium* untuk suspensi jamur.

b. Pembuatan stok bakteri dan jamur

1) Kultur bakteri dan jamur

Masing-masing 1 ose bakteri dan 1 ose jamur dari biakan murni diinokulasikan pada media TSA miring yang telah disterilkan secara *streak plate*. Kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam.

2) Susupensi bakteri dan jamur

1 ose bakteri dan 1 ose jamur dari kultur yang telah dibuat diinokulasikan kedalam 5 ml *Nutrien Broth* untuk bakteri dan 5 ml *Sabouroud Diluted Medium* untuk jamur. Kemudian inkubasikan pada suhu 37 °C selama 24 jam.

c. Pembuatan larutan uji

Berdasarkan orientasi, untuk setiap sampel, yaitu masing-masing ekstrak tanaman dan kontrol positif (kloramfenikol dan ketokonazol) dibuat dengan konsentrasi 5%.

1) Larutan stok fraksi kloroform 5%

± 0,5 gram ekstrak kloroform masing-masing tanaman dilarutkan ke dalam DMSO hingga mencapai volume 10 ml.

2) Larutkan stok fraksi metanol 5%

± 0,5 gram ekstrak metanol masing-masing tanaman dilarutkan ke dalam DMSO hingga mencapai volume 10 ml.

c. Uji antimikroba

Suspensi bakteri dan jamur dibandingkan terlebih dahulu dengan baku *McFarland* nomor 2 (6×10^8 CFU/ml), kemudian masing-masing diambil 200 µl suspensi untuk diinokulasikan ke dalam 15 ml TSA steril secara *pour plate* ke dalam cawan petri. Media agar yang sudah mengandung bakteri digoyang hingga homogen dan dibiarkan memadat. Setelah itu, dibuat lubang-lubang dengan diameter 8 mm sebanyak 4 lubang untuk setiap cawan Petri. Lubang-lubang tersebut sebagai tempat zat uji yaitu fraksi kloroform, fraksi metanol, kontrol negatif (DMSO), dan kontrol positif (kloramfenikol untuk bakteri dan ketokonazol untuk jamur). Volume zat uji yang dimasukkan ke dalam masing-masing lubang sebanyak 20 µl. Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Amati zona hambat (daerah jernih) yang terbentuk disekitar sumuran. Kemudian diukur untuk mengetahui diameter zona hambat.

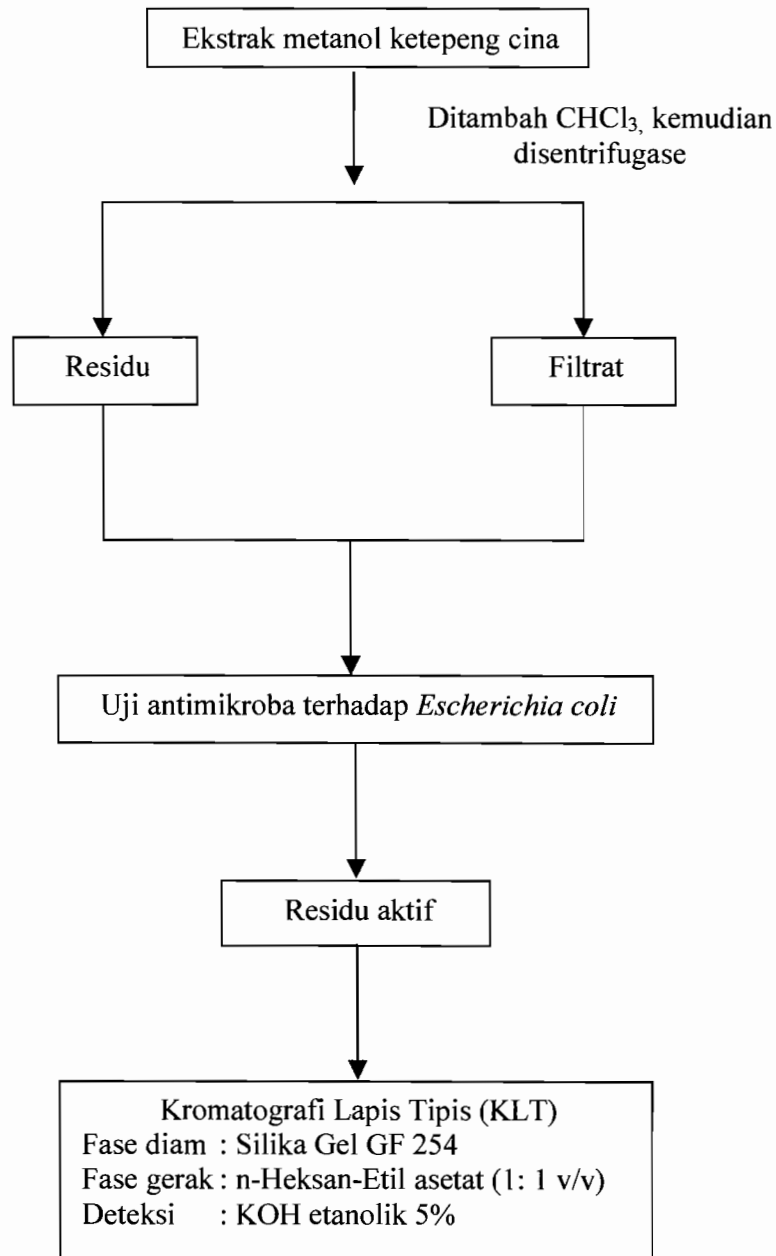
Dari hasil penelitian diketahui bahwa yang mempunyai zona hambat paling besar adalah ekstrak metanol daun ketepeng cina (*Cassia alata* L.) terhadap bakteri *Escherichia coli*, maka untuk langkah selanjutnya yang digunakan adalah ekstrak metanol daun ketepeng cina (*Cassia alata* L.) dan bakteri *Escherichia coli*.

6. Fraksinasi ekstrak metanol ketepeng cina (*Cassia alata* L.)

Ekstrak metanol ketepeng cina (*Cassia alata* L.) ditimbang dengan bobot ± 2 gram, dimasukkan ke dalam tabung sentrifugase dan ditambahkan kloroform sebanyak 2 ml, kemudian disentrifugase dengan kecepatan 1000 rpm selama 15 menit. Replikasi dilakukan sebanyak 3 kali masing-masing dengan penambahan 2 ml kloroform. Endapan dan supernatan yang dihasilkan kemudian dipisahkan menggunakan vacum. Masing-masing diuapkan hingga didapatkan fraksi kental. Setelah itu dilakukan uji antibakteri dari kedua fraksi tersebut terhadap bakteri *Escherichia coli* dengan konsentrasi sampel sebesar 5%. Kemudian di amati zona hambat yang terbentuk.

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa residu mempunyai zona hambat yang lebih besar. Kemudian dilakukan uji kromatografi lapis tipis terhadap residu. Sampel berupa residu yang dilarutkan ke dalam kloroform-metanol (1:1 v/v), filtrat yang dilarutkan ke dalam kloroform, dan ekstrak metanol. Masing-masing sampel ditotolkan pada plat KLT dengan menggunakan silika gel GF 254 sebagai fase diam dan n-heksan-etil asetat (1:1 v/v) sebagai fase gerak, yang dikembangkan pada jarak rambat 8 cm. Bercak yang timbul diamati dibawah sinar

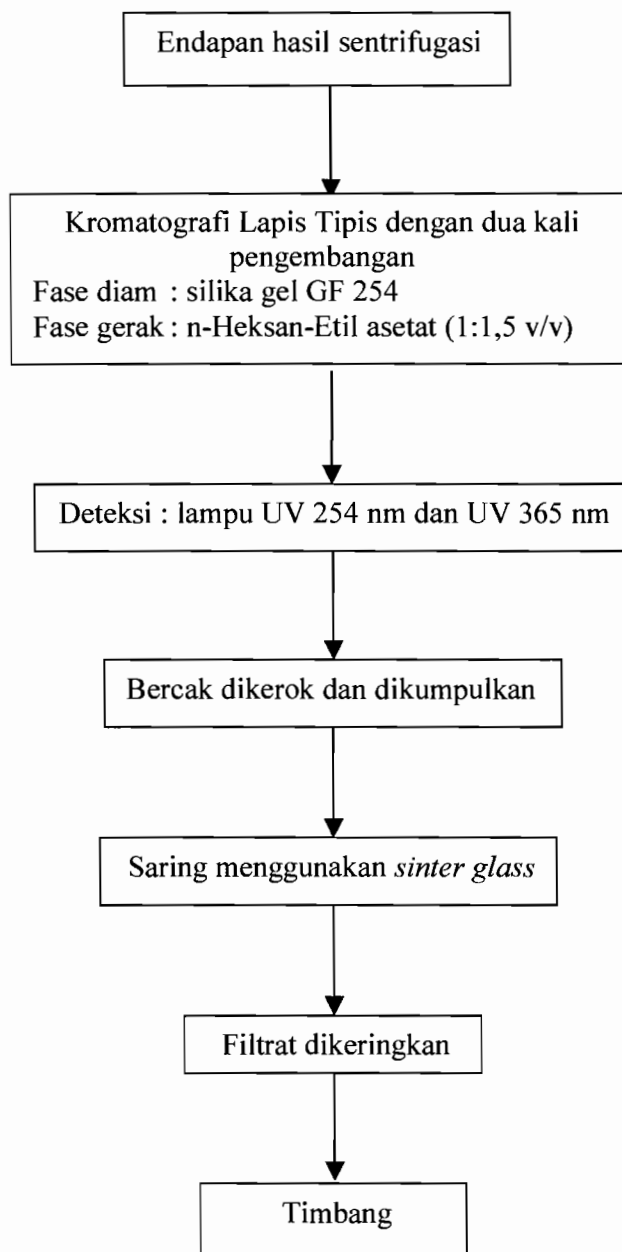
UV 254 nm, sinar UV 365 nm, dan disemprot menggunakan pereaksi penampak bercak KOH etanolik 5%, kemudian dihitung harga Rfnya.



Gambar 2. Skema proses fraksinasi ekstrak metanol daun ketepeng cina (*Cassia alata* L.)

7. Isolasi fraksi aktif ekstrak metanol dengan KLTP

Kromatografi lapis tipis preparatif hanya dilakukan pada residu. Residu kering hasil pemisahan dengan sentrifugase dilarutkan dalam kloroform-metanol (1:1 v/v) dan ditotolkan pada lempeng kromatografi dengan fase diam silika gel GF 254, kemudian dikembangkan dalam bejana kromatografi dengan fase gerak n-heksan-etil asetat (1:1,5 v/v). Penotolan dilakukan sesempit mungkin hingga berupa pita atau garis lurus. Setelah pengembangan selesai dilakukan, lempeng kromatografi dikeringkan dengan diangin-anginkan. Setelah kering dilakukan pengembangan lagi dengan fase gerak yang sama. Setelah pengembangan kedua, lempeng kromatogram diangkat dan dikeringkan. Bercak yang timbul dideteksi dengan lampu UV 254 nm dan UV 356 nm. Bercak kemudian dikerok dan dikumpulkan berdasarkan masing-masing bercak yang dikerok (Hostettmann, dkk, 1995). Setelah itu dilarutkan dalam kloroform-metanol (1:1 v/v) dan disaring menggunakan *sinter glass*. Filtrat yang dihasilkan kemudian diuapkan, dan residu yang dihasilkan ditimbang.



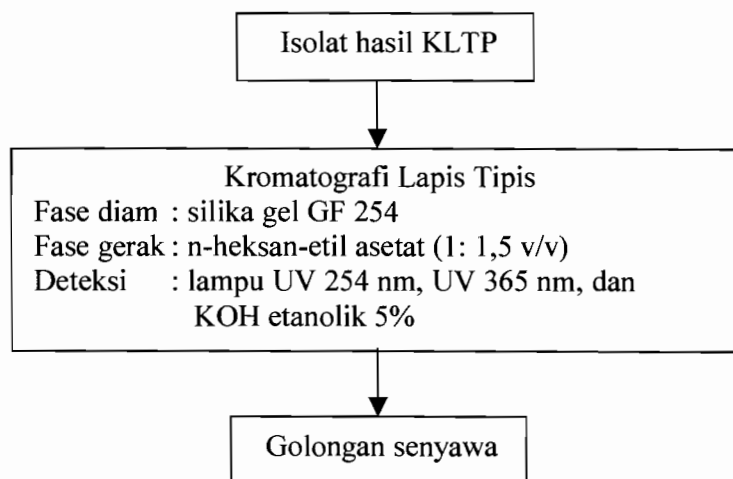
Gambar 3. Skema isolasi ekstrak metanol daun ketepeng cina (*Cassia alata* L.) dengan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP)

8. Uji aktivitas antimikroba isolat

Uji aktivitas antimikroba dilakukan terhadap *Escherichia coli* dengan menggunakan metode difusi secara sumuran. Ukur diameter zona hambat yang terbentuk disekitar sumuran.

9. Uji identitas isolat dengan KLT

Isolat yang telah diuji aktivitas antimikrobanya dikumpulkan, kemudian dilarutkan kedalam kloroform-metanol (1:1 v/v) dan ditotolkan pada pelat KLT dengan fase diam silika gel GF 254. Pelat KLT dikembangkan dalam bejana dengan fase gerak n-heksan-etil asetat (1: 1,5 v/v). Bercak yang timbul kemudian dideteksi dengan lampu UV 254 nm dan UV 365 nm serta pereaksi penampak bercak KOH etanolik 5%. Warna yang terbentuk kemudian diidentifikasi dan dihitung Rfnya.



Gambar 4. Skema uji identitas isolat dengan KLT

F. Tata Cara Analisis Hasil

Data diperoleh berdasarkan uji kemurnian dengan kromatografi lapis tipis dan uji identifikasi warna. Pengamatan dilakukan terhadap bercak yang meliputi warna, luas, intensitas warna dan harga Rf.

Data dari hasil penelitian dianalisis secara deskriptif-komparatif, yaitu dengan menggambarkan dan membandingkan data yang diperoleh dengan buku acuan yang dipergunakan sebagai pedoman (Wagner, 1984).

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan untuk menghindari kesalahan pemilihan bahan tanaman yang digunakan dalam penelitian.

Determinasi tanaman dilakukan menggunakan panduan baku (Backer dan Van Steenis, 1973) untuk tanaman ketepeng cina (*Cassia alata* L.) dan johar (*Cassia siamea* Lmk), sedangkan untuk tanaman dadap ayam (*Erythrina variegata* L.) menggunakan panduan baku (Koorders, 1913).

Berdasarkan hasil determinasi, dipastikan tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah ketepeng cina (*Cassia alata* L.), johar (*Cassia siamea* Lmk), dan dadap ayam (*Erythrina variegatae* L.).

B. Pengumpulan Sampel Tanaman

Daun ketepeng cina (*Cassia alata* L.) dan daun dadap ayam (*Erythrina variegatae* L.) diperoleh dari kebun obat Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma Yogyakarta, sedangkan daun johar (*Cassia siamea* Lmk) diperoleh dari daerah Mrican Yogyakarta. Daun yang diambil adalah daun yang sudah tua, karena diharapkan kandungan senyawa yang terkandung berada dalam jumlah yang maksimal.

C. Pengeringan dan Pembuatan Serbuk

Daun ketepeng cina (*Cassia alata* L.), johar (*Cassia siamea* Lmk), dan dadap ayam (*Erythrina variegatae* L.) dicuci dengan air mengalir, agar kotoran dapat hilang bersama aliran air dan tidak menempel lagi. Ketiga daun yang sudah bersih tersebut ditutup kain hitam dan dijemur dibawah sinar matahari langsung untuk mendapatkan simplisia daun. Tujuan dari pengeringan ini adalah untuk mengurangi kadar air yang terkandung didalam daun. Pengurangan kadar air ini dapat mencegah timbulnya jamur dan juga untuk mencegah terjadinya proses enzimatik yang dapat mempengaruhi kestabilan zat aktif yang terkandung pada daun. Penggunaan kain hitam bertujuan untuk menyerap gelombang panas dari sinar matahari sehingga pengeringan berlangsung optimal dan dapat kering bersamaan, juga untuk melindungi zat aktif yang terdapat pada daun dari sinar ultra violet (UV), karena jika terkena langsung dapat merusak zat aktif yang terkandung didalamnya. Selain itu, untuk melindungi daun dari kotoran dan debu. Daun ketiga tanaman yang digunakan dinyatakan kering apabila diremas dapat hancur.

Tanaman yang telah kering kemudian diserbuk menggunakan blender. Pembuatan serbuk ini dimaksudkan untuk memperluas permukaan serbuk yang bersentuhan dengan cairan penyari dan mereduksi bahan guna mengurangi tebal lapisan batas bahan yang mengandung zat sehingga akan mempermudah proses penyarian dan lebih mudah ditembus oleh cairan penyari. Masing-masing serbuk kemudian diayak untuk memisahkan dari partikel pengotor yang tidak dikehendaki.

D. Penyarian Tanaman Suku *Papilionaceae*

Penyarian dilakukan secara maserasi, yaitu dengan cara merendam serbuk bahan ke dalam cairan penyari kloroform kemudian metanol. Digunakan dua macam penyari karena bahan mengandung zat aktif yang bersifat polar dan non polar, sehingga diharapkan zat aktif yang terkandung di dalam bahan akan tersari seluruhnya. Penggunaan kloroform dimaksudkan untuk menarik senyawa yang bersifat non polar sampai semi polar, sedangkan metanol digunakan untuk menarik senyawa yang bersifat semi polar sampai polar, sehingga diharapkan zat aktif yang terkandung di dalam tanaman tersebut tersari maksimal sesuai dengan sifat polaritasnya. Digunakan metode penyarian maserasi karena metode ini merupakan metode penyarian yang sederhana, mudah dikerjakan, menggunakan peralatan yang sederhana, dan tidak ada pemanasan sehingga zat aktif yang terkandung di dalam bahan tidak rusak.

Penyarian secara maserasi dilakukan dengan cara merendam 200 gram serbuk simplisia dalam cairan penyari. Cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk kerongga sel yang mengandung zat aktif. Zat aktif akan larut karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif didalam sel dengan zat aktif yang berada diluar sel, sehingga larutan yang terpekat akan didesak keluar. Dilakukan replikasi sebanyak tiga kali, dengan tujuan untuk mencapai keseimbangan konsentrasi antara cairan di dalam sel dengan cairan di luar sel, dan untuk menarik zat-zat utama yang mungkin masih ada.

Proses penyarian menghasilkan fraksi kloroform dan fraksi metanol yang selanjutnya diuapkan sampai kental. Kedua fraksi ini kemudian digunakan

untuk uji antibakteri dan dideteksi kandungannya dengan kromatografi lapis tipis preparatif.

Tabel I. Hasil maserasi serbuk daun tanaman suku *Leguminosae*

Maserat	Nama Tanaman	Berat ekstrak kental ($\bar{X} \pm SD$) (gram)	Rendemen (% b/b)
Kloroform	Johar	$7,92 \pm 0,46$	3,96
	Ketepeng cina	$18,03 \pm 0,34$	9,01
	Dadap ayam	$13,27 \pm 0,62$	6,63
Metanol	Johar	$12,42 \pm 0,09$	6,21
	Ketepeng cina	$28,00 \pm 0,79$	14,00
	Dadap ayam	$24,53 \pm 0,57$	12,26

E. Hasil Uji Aktivitas Antimikroba

Uji aktivitas antimikroba dilakukan sebagai uji pendahuluan. Pengujian aktivitas antimikroba menggunakan metode difusi dengan cara sumuran yang berdiameter 8 mm. Adanya aktivitas antimikroba ditunjukkan dengan terbentuknya daerah jernih disekitar sumuran. Masing-masing subjek uji mendapat perlakuan yang sama, yaitu diuji dengan ekstrak kloroform dan ekstrak metanol daun dadap ayam, johar, dan ketepeng cina, dengan konsentrasi yang sama yaitu 5%. Pada penelitian ini digunakan kloramfenikol 5% sebagai kontrol positif terhadap bakteri dan ketokonazol 5% sebagai kontrol positif terhadap fungi. Kontrol positif berfungsi untuk mengontrol atau mengetahui kondisi bakteri atau jamur terhadap antibiotik, untuk mengetahui apakah bakteri atau jamur tersebut sudah resisten atau belum, untuk mengetahui apakah bahan-bahan yang digunakan mempunyai aktivitas yang sama atau tidak dengan antibiotik. Sedangkan sebagai kontrol negatif digunakan DMSO, yang berfungsi sebagai pelarut untuk membantu difusi zat aktif ke dalam media dan untuk memastikan bahwa pelarut tidak mempunyai aktivitas antimikroba. Volume zat uji, kontrol positif, dan kontrol negatif yang dimasukkan ke dalam sumuran adalah sebesar 20 μ l. Adapun pemilihan kloramfenikol sebagai kontrol positif karena kloramfenikol merupakan antibiotika berspektrum luas yang efektif terhadap bakteri Gram positif dan Gram negatif (Volk & Wheeler, 1988). Ketokonazol dipilih sebagai kontrol positif karena ketokonazol merupakan turunan imidazol yang efektif terhadap candida (Anonim, 1995).

Hasil uji aktivitas antimikroba ekstrak kloroform dan ekstrak metanol daun dadap ayam, johar, dan ketepeng cina ditunjukkan dengan terbentuknya zona hambat disekitar sumuran. Zona hambat tersebut dapat berupa daerah jernih disekitar sumuran atau dapat pula berupa daerah yang kurang jernih. Zona hambat tersebut kemudian diukur dan selanjutnya digunakan sebagai data diameter hambat dari pengujian aktivitas antimikroba.

Tabel II. Hasil uji antimikroba ekstrak serbuk simplisia dengan konsentrasi 5% b/v

Ekstrak	Tanaman	Rerata Diameter Zona Hambat ($\bar{X} \pm SD$) (mm)		
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
Kloroform	Johar	2,6 ± 1,82	2,8 ± 1,48	2,4 ± 1,14
	Ketepeng cina	3,4 ± 1,82	3,4 ± 1,52	2,8 ± 1,48
	Dadap	4,2 ± 0,84	3,2 ± 2,17	5,8 ± 1,30
Metanol	Johar	6,2 ± 2,28	9,0 ± 2,55	2,4 ± 0,89
	Ketepeng cina	6,8 ± 3,2	10,2 ± 2,77	8,0 ± 2,45
	Dadap ayam	7,0 ± 3,53	7,0 ± 4,64	3,0 ± 1,41
Kloramfenikol		28,2 ± 0,84	27,6 ± 2,07	2,82 ± 0,84
DMSO		0,00	0,00	0,00

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun ketepeng cina memiliki rerata diameter zona hambat paling besar dibandingkan dengan ekstrak kloroformnya dan kedua ekstrak tanaman yang lain, yaitu johar dan dadap ayam.. Perbedaan tersebut dipengaruhi oleh komposisi senyawa yang terdapat pada masing-masing ekstrak dan proporsi senyawa yang diperkirakan aktif

sebagai antimikroba atau yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba. Rerata diameter zona hambat kedua ekstrak dari ketiga tanaman tersebut lebih kecil dibandingkan rerata diameter kontrol positif. Hal ini disebabkan aktivitas antimikrobanya lebih rendah atau kurang baik.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa dengan perlakuan dan konsentrasi yang sama, daya hambat ekstrak metanol daun ketepeng cina terhadap pertumbuhan *Escherichia coli* lebih besar dibandingkan terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan jamur *Candida albicans*. Hal ini kemungkinan disebabkan adanya perbedaan struktur dan komponen penyusun dinding sel bakteri Gram positif dan Gram negatif. *Staphylococcus aureus* termasuk bakteri Gram positif. Dinding sel bakteri Gram positif adalah cukup tebal (20-80 nm) dan terdiri atas 60 sampai 100 persen peptidoglikan. Peptidoglikan adalah molekul yang sangat besar – molekul yang meliputi seluruh sel – tersusun dari *N*-asetil glukosamin dan asam *N*-asetil muramat, yang berfungsi memberikan kekakuan yang dibutuhkan untuk mempertahankan keutuhan sel (Volk & Wheeler, 1988). *Escherichia coli* termasuk bakteri Gram negatif. Dinding sel bakteri Gram negatif mengandung lebih sedikit peptidoglikan (10 sampai 20 persen bobot kering dinding sel) (Volk & Wheeler, 1988). Berdasarkan hal inilah zat uji lebih sukar menembus dinding sel bakteri *Staphylococcus aureus* (Gram positif) daripada bakteri *Escherichia coli* (Gram negatif).

F. Hasil Fraksinasi Ekstrak Metanol Daun Ketepeng Cina

(*Cassia alata* L.)

Fraksinasi dimaksudkan untuk memperoleh fraksi aktif dari ekstrak metanol daun ketepeng Cina. Ekstrak metanol daun ketepeng Cina disentrifugase dengan menggunakan pelarut kloroform. Kloroform berfungsi untuk mengendapkan senyawa yang larut dalam kloroform. Dari hasil sentrifugase didapatkan residu (endapan) dan filtrat (cairan).

G. Uji Aktivitas Antimikroba Hasil Fraksinasi

Uji aktivitas antimikroba hasil sentrifugase dimaksudkan untuk mengetahui fraksi mana yang aktif sebagai antimikroba dari ekstrak metanol ketepeng Cina (*Cassia alata* L.). Hasil penelitian menunjukkan bahwa residu memiliki diameter zona hambat sebesar 6,93 mm. Filtrat dan kontrol negatif tidak menimbulkan zona hambat, sehingga yang memiliki aktivitas antimikroba adalah residu.

Tabel III. Purata diameter zona hambat residu dan filtrat ekstrak metanol ketepeng Cina (*Cassia alata* L.) hasil sentrifugasi

Zat Uji	Rerata Diameter Zona Hambat ($\bar{X} \pm SD$) (mm)
Residu	6,93 ± 0,05
Filtrat	0,00
DMSO	0,00

H. Profil Kromatografi Lapis Tipis Residu Hasil Fraksinasi

Pemilihan metode kromatografi lapis tipis didasarkan pada beberapa alasan, yaitu membutuhkan penyerap dan cuplikan dalam jumlah yang sedikit, membutuhkan waktu yang lebih cepat, dan diperoleh pemisahan yang lebih baik (Stahl, 1985). Uji kromatografi lapis tipis dimaksudkan untuk mengetahui apakah residu tersebut benar-benar berasal dari senyawa-senyawa yang larut dalam metanol. Uji kromatografi lapis tipis dilakukan dengan fase diam silika gel GF 254 dan fase gerak n-heksan-etil asetat (1: 1 v/v). Silika gel GF 254 artinya silika yang ditambahkan kalsium sulfat sebagai pengikat dan indikator fluoresensi, yang dapat berfluoresensi pada panjang gelombang 254 nm. Setelah dilakukan pengembangan, bercak yang timbul kemudian diidentifikasi.

Hasil uji kromatografi lapis tipis menunjukkan bahwa bercak dari masing-masing sampel memiliki warna yang sama yaitu berwarna merah muda setelah disemprot dengan KOH 5%. Harga R_f yang dihasilkan juga hampir sama

I. Hasil Uji Kromatografi Lapis Tipis Preparatif

Uji kromatografi lapis tipis hanya dilakukan pada endapan hasil sentrifugase, karena bercak yang ditimbulkan pada pemeriksaan hasil kromatogram dengan kromatografi lapis tipis lebih intensif bila dibandingkan dengan bercak yang ditimbulkan oleh filtrat. Uji kromatografi lapis tipis ini dilakukan untuk mengisolasi senyawa yang terkandung dalam ketepeng cina yang diperkirakan memiliki antimikroba. Fase gerak yang digunakan pada kromatografi lapis tipis preparatif ini adalah n-heksana-etil asetat (1:1,5 v/v), sedangkan fase diamnya sama dengan yang digunakan pada uji kromatografi lapis tipis. Cuplikan ditotolkan pada pelat sesempit mungkin supaya tidak terjadi pelebaran. Pelat selanjutnya dikembangkan pada bejana yang telah jenuh dengan fase gerak. Untuk mengetahui kejenuhan bejana, diletakkan sehelai kertas saring yang ujungnya tercelup dalam pelarut pengembang. Pada proses ini dilakukan pengembangan dua kali, yaitu setelah pengembangan pertama pelat KLT dikeringkan, setelah kering pelat KLT dikembangkan lagi dengan pengembang yang sama. Tujuan dari elusi berulang adalah memisahkan dua bercak yang letaknya terlalu berdekatan satu dengan yang lain. Pada pengamatan visual, tampak bercak berwarna kuning. Deteksi dengan UV 254 nm dan 365 nm berturut-turut tampak bercak berwarna kuning dan merah. Bercak yang ditimbulkan ini sama dengan bercak yang ditimbulkan pada kromatografi lapis tipis. Bercak kemudian dikerok dan dilarutkan dalam kloroform-metanol (1:1 v/v) lalu disaring dengan *sinter glass*. Bercak yang dikerok pertama kali adalah bercak I (B₁), yaitu bercak yang warnanya terlihat lebih jelas, lebih intensif dan lebih luas dibandingkan bercak II

(B_{II}) (lampiran 5). Filtrat yang diperoleh kemudian diuapkan hingga kering dan digunakan untuk sampel uji antibakteri isolat dan uji identitas isolat.

Tabel V. Hasil Uji Kromatografi Lapis Tipis Preparatif dengan fase diam silika gel GF 254 dan fase gerak n-heksan-etil asetat (1: 1,5 v/v)

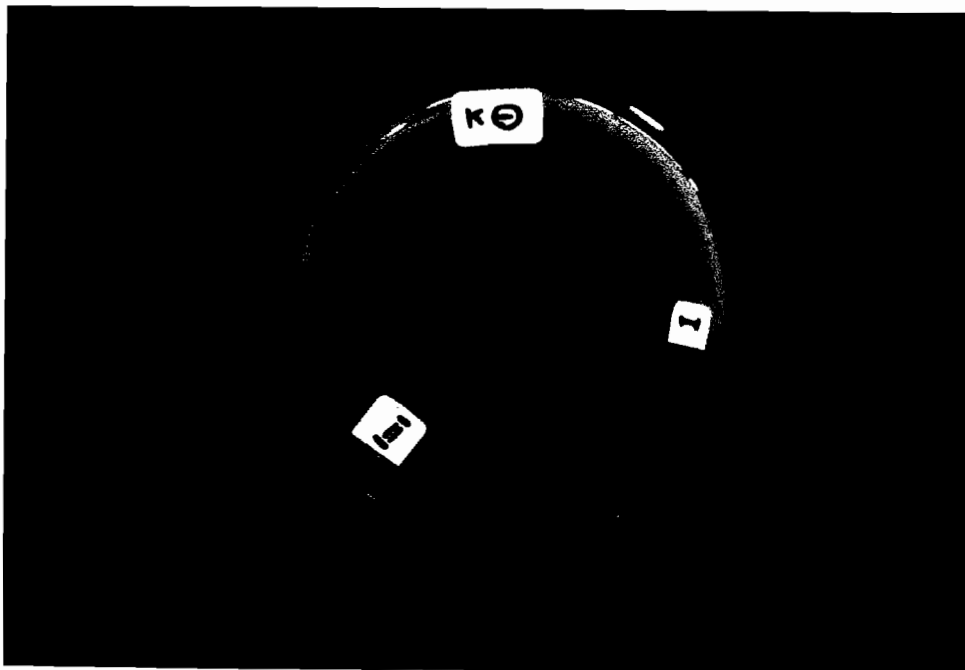
	Visibel	Sinar UV 254 nm	Sinar UV 365 nm
Bercak I	Kuning	Kuning	Merah
Bercak II	Kuning	Kuning	Merah

J. Uji Antimikroba Isolat Hasil Kromatografi Lapis Tipis Preparatif

Pada uji antimikroba ini digunakan metode yang sama seperti pada uji antimikroba sebelumnya. Hasilnya menunjukkan bahwa bercak pertama memiliki diameter zona hambat yang lebih besar dibandingkan dengan bercak kedua.

Tabel VI. Purata diameter zona hambat hasil KLTP isolat I dan II

	Rerata diameter zona hambat ($X \pm SD$) (mm)
I	$13,53 \pm 0,58$
II	$8,87 \pm 0,58$
DMSO	0,00



**Gambar 5. Uji Antimikroba Fraksi Aktif Ekstrak Metanol Ketepeng cina
(*Cassia alata* L.) Hasil KLTP Terhadap *Escherichia coli***

Keterangan :

- I : Bercak pertama ekstrak metanol ketepeng cina
- II : Bercak kedua ekstrak metanol ketepeng cina
- K(-) : Kontrol negatif (DMSO)

K. Hasil Uji Identitas Isolat Secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Uji ini dimaksudkan untuk mengetahui identitas senyawa yang diperkirakan memiliki antimikroba. Sampel yang digunakan berasal dari bercak pertama karena memiliki zona hambat lebih besar, sehingga diperkirakan mengandung senyawa lebih banyak. Uji ini dilakukan dengan menggunakan fase diam silika Gel GF 254 nm dan fase gerak n-heksan-etil asetat 1: 1,5 v/v.

Hasil identifikasi menunjukkan bahwa secara visual diperoleh bercak yang berwarna kuning. Deteksi dengan sinar ultraviolet 254 nm dan sinar ultra violet 365 nm juga bercak berwarna kuning (lampiran 9). Kemudian deteksi dilanjutkan dengan menggunakan pereaksi penyemprot kalium hidroksida 5%, hasilnya menunjukkan bahwa diamati dibawah sinar ultraviolet 254 nm dan 365 nm bercak berwarna merah meredam (lampiran 10).

Dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa fraksi aktif ekstrak metanol ketepeng cina mengandung senyawa antrakinon. Antrakinon dengan adanya kalium hidroksida 5% menghasilkan warna merah (Wagner, 1984).

BAB V

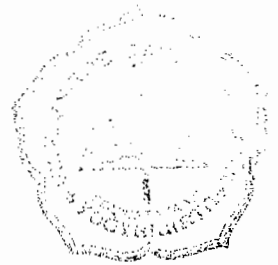
KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

1. Fraksi yang aktif sebagai antimikroba adalah fraksi dari ekstrak metanol ketepeng cina (*Cassia alata* L.) terhadap *Escherichia coli*
2. Senyawa yang terkandung didalam fraksi tersebut termasuk golongan antrakinon

B. Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui kadar hambat minimal (KHM) dan kadar bunuh minimal (KBM) dari fraksi aktif ekstrak metanol ketepeng cina (*Cassia alata* L.)
2. Perlu dilakukan identifikasi kandungan senyawa kimia utama isolat fraksi aktif ekstrak metanol dengan menggunakan spektrofotometri dan infra merah.



DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 1985, *Cara Pembuatan Simplisia*, Depkes RI., Jakarta, 105-109, 125
- Anonim, 1986, *Sediaan Galenik*, Depkes RI., Jakarta, 1-16
- Anonim, 1989, *Materia Medika Indonesia*, Jilid V, Depkes RI., Jakarta, 124-128, 129-133, 203-207.
- Anonim, 1992, *Dasar-Dasar Pemeriksaan Mikrobiologi*, Jilid II, Fakultas Kedokteran UGM, Yogyakarta.
- Anonim, 1994, *Buku Ajar Mikrobiologi Kedokteran*, Edisi Revisi, Staf Pengajar Fakultas Kedokteran UI, Penerbit Binarupa Aksara, Jakarta.
- Anonim, 1995, *Farmakope Indonesia*, Edisi 4, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta, 189, 486
- Anonim, 2000, *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*, Depkes RI., Jakarta.
- Backer, C.A., Van Steenis, J, 1973, *Atlas of 220 Weeds of Sugar-Cane Fields in Java*, Amsterdam, 280-281.
- Bonang, G. dan Koeswardono, E.S., 1982, *Mikrobiologi Kedokteran untuk Laboratorium dan Klinik*, Gramedia, Jakarta.
- Franklin, T.J., and Snow, G.A., 1989, *Biochemistry of Antimicrobial Action*, 4th Ed, Chapman and Hall, London.
- Gasparic, J., 1978, *Laboratory Handbook of Paper and Thin Layer Chromatography*, Ellis Hoorwod Limited.
- Harbone, J.B., *Metode Fitokimia*, 1987, Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan, Terbitan kedua, Penerbit ITB, Bandung, 109-116.
- Heyne, K., 1987, *Tumbuhan Berguna Indonesia*, Jilid III, diterjemahkan oleh Badan Litbang Kehutanan, Yayasan Sarana Wana Jaya, Jakarta.
- Hostettman, K, M., A. Marston, 1986, *Cara Kromatografi Preparatif; Penggunaan pada isolasi senyawa alam*, Penerbit ITB, Bandung, 33-34.

- Hugo, W. B., and Russel, A.D., 1987, *Pharmaceutical Microbiology*, Blackwell Scientific Publication, Oxford.
- Jawetz, E. J. L., Melnick, F. A. Adelburg, 1986, *Microbiology untuk Profesi kesehatan*, diterjemahkan oleh A. Tonang, Edisi XVI, Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- Jawetz, E. J. L., Melnick, F. A. Adelburg, 1995, *Medical Microbiology*, Edisi 20, diterjemahkan oleh Nugroho, E., Maulany, R.F., Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- Koordern, S.H., Valeton, 1913, *Atlas Der Baumarten Von Java*, Buch-Und Steindruckerei Von fa, Leiden, 27.
- Lay, B. W., 1994, *Analisis Mikroba di Laboratorium*, Penerbit PT. Raja Grafindo Persada, Jakarta.
- Mursyidi, A., 1990, *Analisis Metabolit Sekunder*, Pusat Antar Universitas Bioteknologi, UGM, Yogyakarta.
- Pelczar, M. J., dan Chan, E. C. S., 1986, *Dasar-Dasar Mikrobiologi*, diterjemahkan oleh Hadieoetomo, R. S., Teja Imas, Tjitrosoma, S. S., Angka, S. L., Jilid I, UI Press, Jakarta.
- Robinson, Trevor, 1995, *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata, 153, Institut Teknologi Bandung
- Salle, A. J., 1961, *Fundamental Principle of Microbiology*, Edisi V, Mc Graw Hill Book Company Inc, New York
- Sastrapradja, S.D., 1986, *Indeks Tumbuh-tumbuhan Obat di Indonesia*, PT. Eisai Indonesia.
- Sastrohamijoyo, H., 1985, *Kromatografi*, Penerbit Liberty, Yogyakarta.
- Soedibyoy, B. R. A. Mooryati, 1998, *Alam Sumber Kesehatan*, Edisi I, Balai Pustaka, 118-119, 179-180, 218-219. Jakarta.
- Stahl, Egon, 1985, *Analisis Obat Secara Kromatografi dan Mikroskopi*, diterjemahkan oleh Padmawinata, K. dan Sudiro, L., ITB, Bandung, 81. 89-95.

- Syamsuhidayat. S.S., dan Hutapea. J.R., 1991, *Inventaris Tanaman Obat Indonesia*, Jilid I, Depkes RI., Jakarta
- Tjay, Hoan Tan, dan Kirana, Rahardja, 2002, *Obat-obat Penting, Khasiat, Penggunaan, dan Efek-efek Sampingnya*, PT. Elex Media Komputindo, Jakarta, 54, 59, 82, 99,
- Trihendrokesowo, 1986, *Dasar-Dasar Pemeriksaan Mikrobiologi*, Fakultas Kedokteran UGM, Yogyakarta.
- Unus, S., 1985, *Pengantar Mikrobiologi Umum*, Penerbit Angkasa, Bandung.
- Volk, W. A. and Wheeler, M.F., 1988, *Mikrobiologi Dasar*, Jilid I, Edisi ke-5, Penerbit Erlangga, Jakarta.
- Volk, W. A. and Wheeler, M.F., 1990, *Mikrobiologi Dasar*, Jilid II, Edisi ke-5, Penerbit Erlangga, Jakarta.
- Wagner, H., Blatt, S., 1984, *Plant Drug Analysis-A Thin Layer Chromatography Atlas*, 225-226, Springer-Verlag, Berlin.
- Wahyuwono, Subagus, 1991, *Antiinfective Agents Isolated from Artemisia Passiflora Nutt., and Guardiola Platyphylla Gray.*, Ph.D. Dissertation Graduate Collage, The University of Arizona, Tucson.
- Wijayakusuma, H., Dalimartha, S., Wirian, A.S., 1993, *Tanaman Berkhasiat Obat di Indonesia*, Jilid IV, Pustaka Kartini, Jakarta.

Lampiran 1



FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS SANATA DHARMA

(Kampus III): Paingan, Maguwoharjo, Depok, Sleman, Yogyakarta 55284
Telp. (0274) 883037, 883968 Fax. (0274) 886529-Telegram : SADHAR YOGYA
E-mail: Farmasi@usd.ac.id

SURAT PENGESAHAN DETERMINASI

Nomor : 357 /LKTO/far-USD/ 08 / 05

Laboratorium Kebun Obat, Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma, menyatakan bahwa telah dilakukan determinasi terhadap suatu contoh tanaman, dengan nama:

Erythrina variegata Lmk
(Dadap ayam)

Determinasi telah dilakukan secara benar sesuai dengan :

Koorders, S.H., Valetton, 1913, *Atlas Der Baumarten Von Java, Buch-Und Steindruckerei Von fa, 27, Leiden.*

Hingga kategori : Jenis (spesies)

Tanaman tersebut dipakai dalam penelitian :

Isolasi Fraksi Aktif Antimikroba Daun Ketepeng Cina (*Cassia alata* L.) Terhadap
Escherichia coli

Oleh : Yuli Novia
dari : Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma

Herbarium disimpan oleh Laboratorium Biologi Umum, Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma, dengan nomor katalog:

demikian surat pengesahan determinasi ini dibuat untuk dapat digunakan sebagaimana mestinya.

Yogyakarta, 18 Februari 2005

Mengesahkan,

Kepala Laboratorium Kebun Obat

(Maria dwi budi Jumpowati, S.si)

(Ign. Y. Kristio Budiasmoro, M.Si.)

Lampiran 2



FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS SANATA DHARMA

(Kampus III): Paingan, Maguwoharjo, Depok, Sleman, Yogyakarta 55284
Telp. (0274) 883037, 883968 Fax. (0274) 886529–Telegram : SADHAR YOGYA
E-mail: Farmasi@usd.ac.id

SURAT PENGESAHAN DETERMINASI

Nomor : 356 /LKTO/far-USD/ 08 / 05

Laboratorium Kebun Obat, Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma, menyatakan bahwa telah dilakukan determinasi terhadap suatu contoh tanaman, dengan nama:

Cassia siamea Lamk
(Johar)

Determinasi telah dilakukan secara benar sesuai dengan :

Backer, C.A., Van Steenis, J, 1973, *Atlas of 220 Weeds of Sugar-Cane Fields in Java*,
280-281, Amsterdam.

Hingga kategori : Jenis (spesies)

Tanaman tersebut dipakai dalam penelitian :

Isolasi Fraksi Aktif Antimikroba Daun Ketepeng Cina (*Cassia alata* L.) Terhadap
Escherichia coli

Oleh : Yuli Novia
dari : Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma

Herbarium disimpan oleh Laboratorium Biologi Umum, Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma, dengan nomor katalog:

demikian surat pengesahan determinasi ini dibuat untuk dapat digunakan sebagaimana mestinya.

Yogyakarta, 18 Februari 2005

Mengesahkan,

Kepala Laboratorium Kebun Obat

(Maria dwi budi Jumpowati, S.si)

Determinator,

(Ign. Y. Kristio Budiasmoro, M.Si.)

Lampiran 3



FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS SANATA DHARMA

(Kampus III): Paingan, Maguwoharjo, Depok, Sleman, Yogyakarta 55284
Telp. (0274) 883037, 883968 Fax. (0274) 886529-Telegram : SADHAR YOGYA
E-mail: Farmasi@usd.ac.id

SURAT PENGESAHAN DETERMINASI

Nomor : 355 /LKTO/far-USD/08 / 05

Laboratorium Kebun Obat, Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma, menyatakan bahwa telah dilakukan determinasi terhadap suatu contoh tanaman, dengan nama:

Cassia alata L.
(Ketepeng Cina)

Determinasi telah dilakukan secara benar sesuai dengan :

Backer, C.A., Van Steenis, J, 1973, *Atlas of 220 Weeds of Sugar-Cane Fields in Java*,
280-281, Amsterdam.

Hingga kategori : Jenis (spesies)

Tanaman tersebut dipakai dalam penelitian :

Isolasi Fraksi Aktif Antimikroba Daun Ketepeng Cina (*Cassia alata L.*) Terhadap
Escherichia coli

Oleh : Yuli Novia
dari : Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma

Herbarium disimpan oleh Laboratorium Biologi Umum, Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma, dengan nomor katalog:

demikian surat pengesahan determinasi ini dibuat untuk dapat digunakan sebagaimana mestinya.

Yogyakarta, 18 Februari 2005

Mengesahkan,

Kepala Laboratorium Kebun Obat

(Maria dwi budi Jumpowati, S.si)

Determinator,

(Ign. Y. Kristio Budiasmoro, M.Si.)

Lampiran 4



Gambar 7. Dadap ayam (*Erythrina variegatae* (L.) Merr.)

Lampiran 5

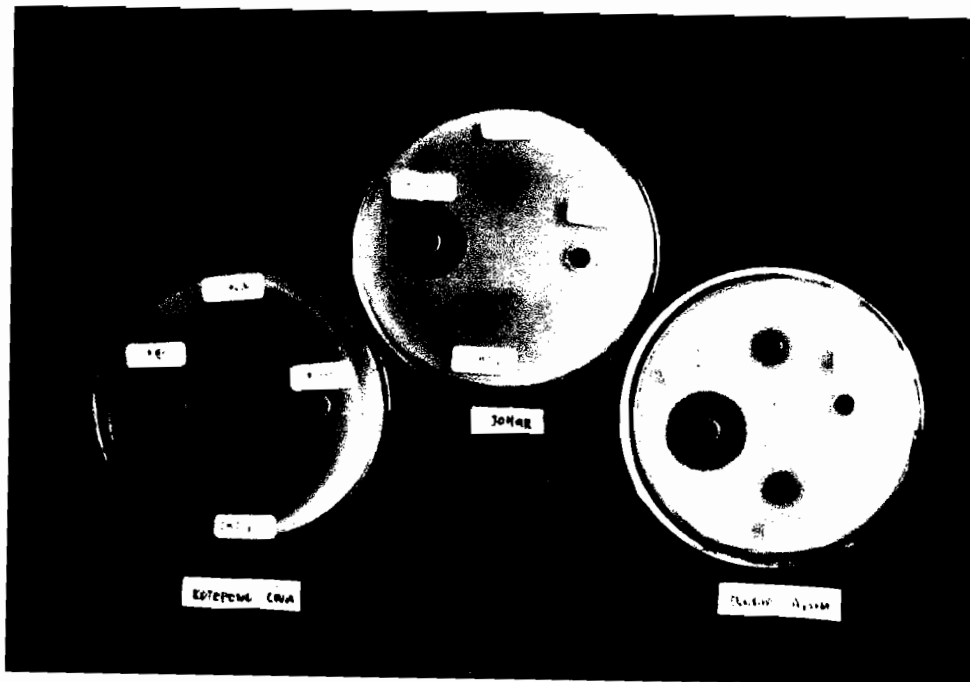


Gambar 8. Johar (*Cassia siamea* Lamk)

Lampiran 6

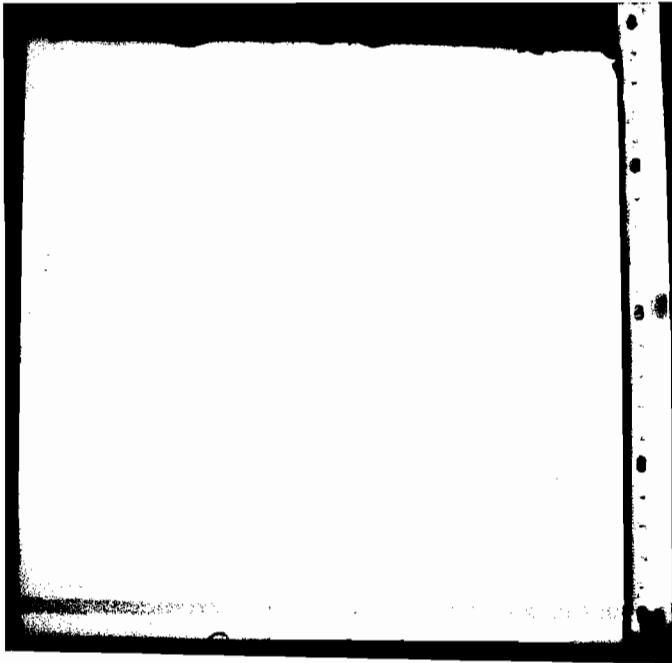
Gambar 9. Ketepeng cina (*Cassia alata* L.)

Lampiran 7

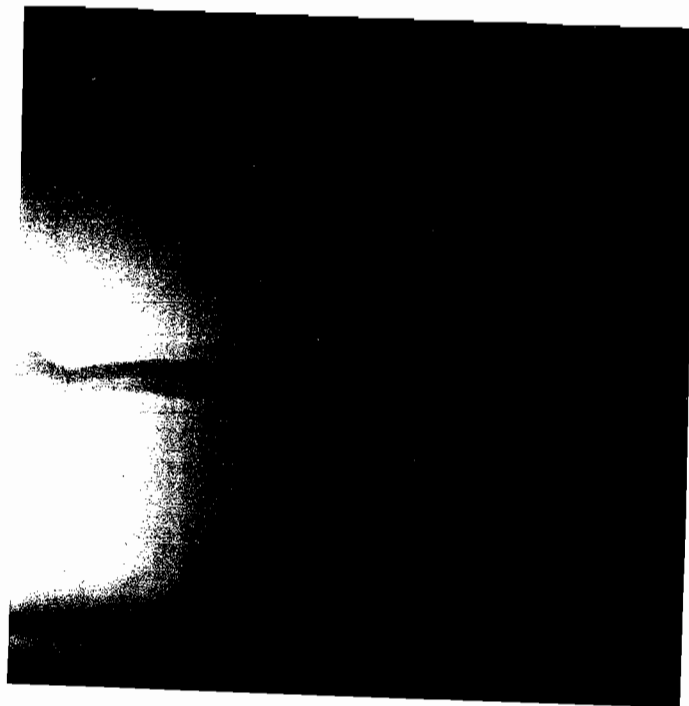


**Gambar 10. Uji Antimikroba Daun Dadap ayam (*Erythrina variegatae* (L.) Merr.),
Johar (*Cassia siamea* Lamk), Ketepeng cina (*Cassia alata* L.)
Terhadap *Escherichia coli***

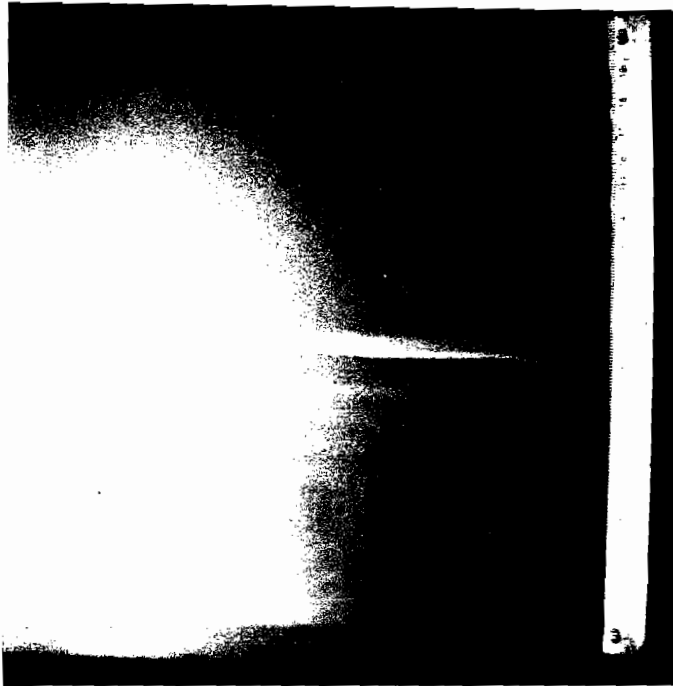
Lampiran 8.



I



II

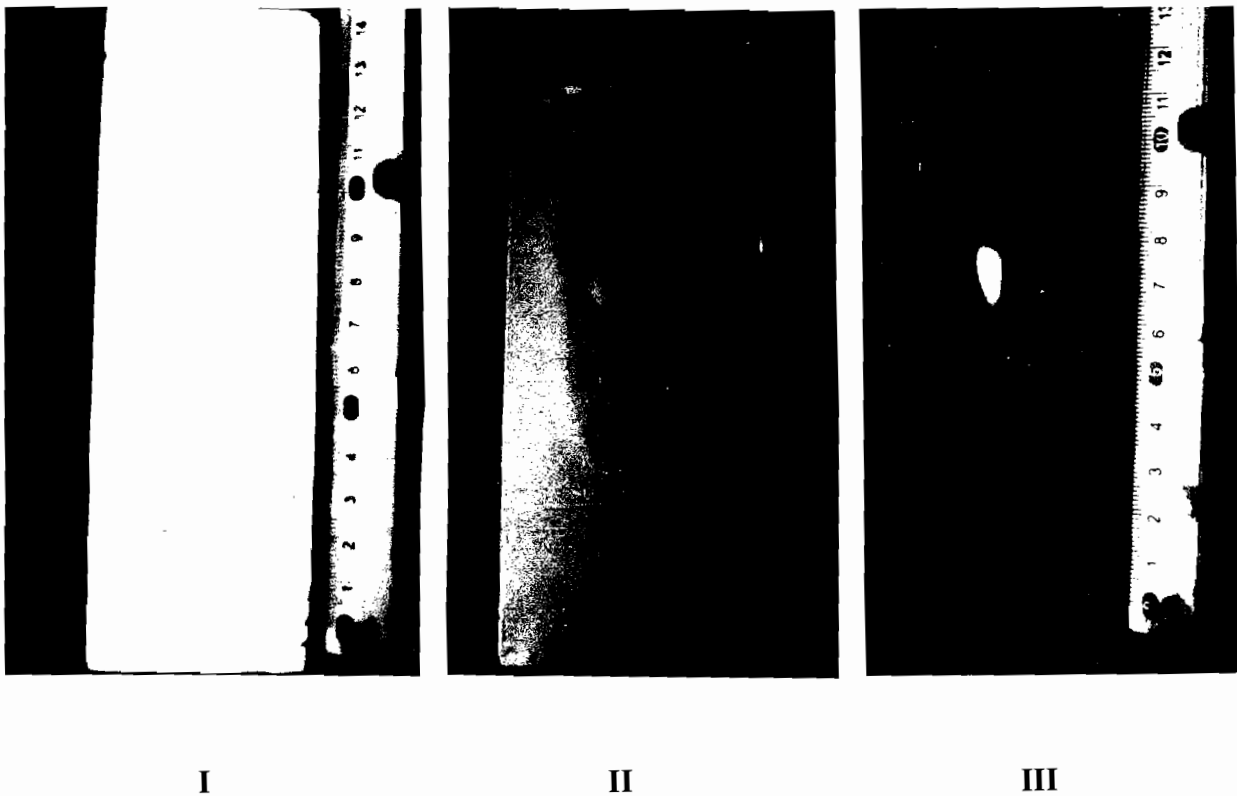


III

Gambar 11. Uji Kromatografi Lapis Tipis Preparatif dengan fase diam silika gel GF 254 dan fase gerak n-heksan-etil asetat (1: 1,5 v/v)

Keterangan : Sinar tampak (I), sinar UV 254 nm (II), sinar UV 365 nm (III)

Lampiran 9.



Gambar 12. Uji Identitas Isolat Secara Kromatografi Lapis Tipis fase diam silika gel GF 254 dan fase gerak n-heksan-etil asetat (1: 1,5 v/v)

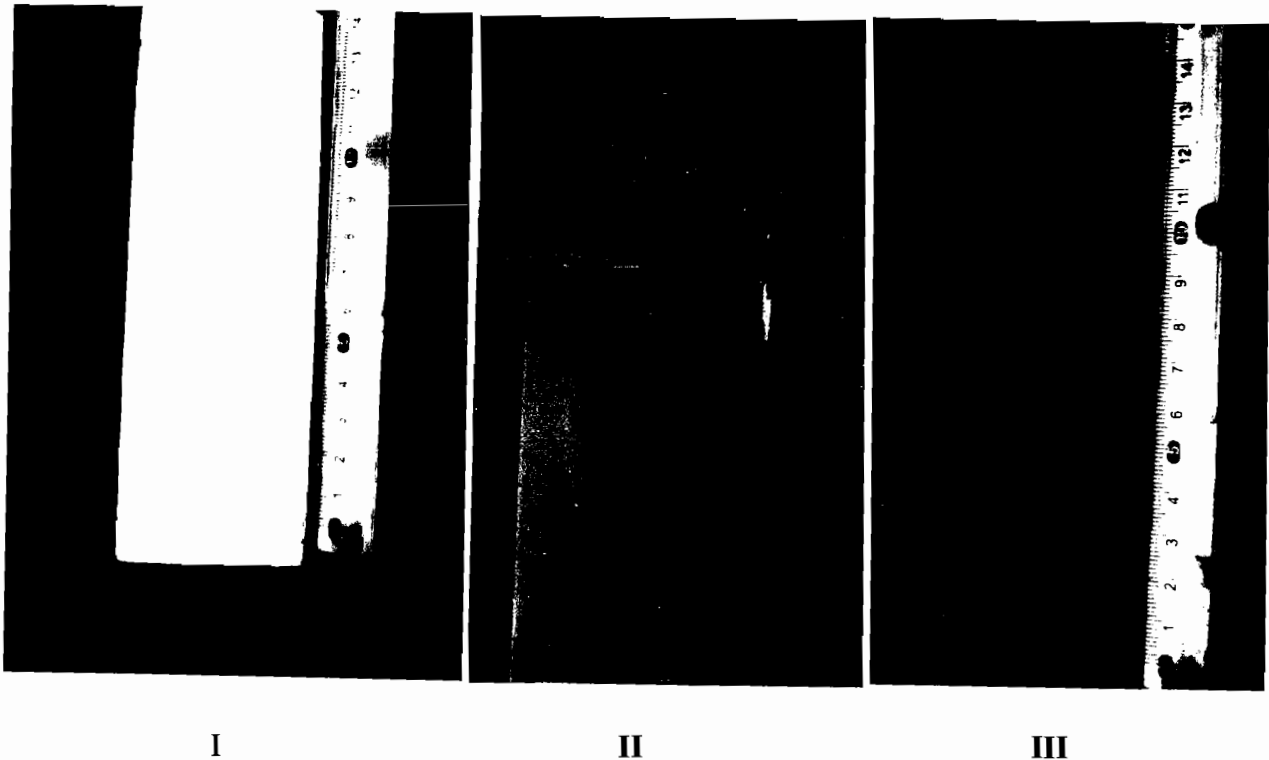
Keterangan :

I. Sinar tampak

II. Sinar UV 254 nm

III. Sinar UV 365 nm

Lampiran 10.



Gambar 12. Uji Identitas Isolat Secara Kromatografi Lapis Tipis fase diam silika gel GF 254 dan fase gerak n-heksan-etil asetat (1: 1,5 v/v) dengan pereaksi KOH 5%

Keterangan :

I. Sinar tampak

II. Sinar UV 254 nm

III. Sinar UV 365 nm



BIOGRAFI PENULIS



YULI NOVIA lahir pada tanggal 1 Juli 1982, di Cianjur, Jawa Barat. Menjalani pendidikan Sekolah Dasar di SDN Cipanas III, tamat dari Sekolah Menengah Pertama Mardi Yuana I, Sukabumi, pada tahun 1997. Kemudian pada tahun 2000 tamat dari Sekolah Menengah Umum Mardi Yuana, Sukabumi, dan berhasil menyelesaikan S1 di Fakultas Farmasi Universitas

Sanata Dharma, Yogyakarta pada 2005.

Selama menempuh pendidikan di Fakultas Farmasi, penulis aktif dalam berbagai kegiatan baik di luar kampus maupun bidang kemahasiswaan, seperti Badan Eksekutif Mahasiswa Fakultas pada tahun 2001-2003, dan Badan Pengawas Mahasiswa Universitas pada tahun 2002-2003.