

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI DAN FITOKIMIA FRAKSI
n-HEKSANA, ETIL ASETAT, DAN AIR HASIL HIDROLISIS EKSTRAK
METANOL DAUN BELUNTAS (*Pluchea Indica* L.) TERHADAP BAKTERI
*Staphylococcus aureus***

SKRIPSI

**Oleh:
AGNES FEBRIA SANDI
NIM: 17630041**



**PROGRAM STUDI KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2022**

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI DAN FITOKIMIA FRAKSI
n-HEKSANA, ETIL ASETAT, DAN AIR HASIL HIDROLISIS EKSTRAK
METANOL DAUN BELUNTAS (*Pluchea indica* L.) TERHADAP BAKTERI
*Staphylococcus aureus***

SKRIPSI

**Oleh:
AGNES FEBRIA SANDI
NIM. 17630041**

**Diajukan Kepada:
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Ibrahim Malang
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam
Memperoleh Gelar Sarjana (S.Si)**

**PROGRAM STUDI KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2022**

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI DAN FITOKIMIA FRAKSI
n-HEKSANA, ETIL ASETAT, DAN AIR HASIL HIDROLISIS EKSTRAK
METANOL DAUN BELUNTAS (*Pluchea indica* L.) TERHADAP BAKTERI
*Staphylococcus aureus***

SKRIPSI

**Oleh:
AGNES FEBRIA SANDI
NIM. 17630041**

**Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji
Tanggal: 17 Mei 2022**

Pembimbing I



**A. Ghana'im Fasya, M.Si
NIP. 19820616 200604 1 002**

Pembimbing II



**Lulu'atul Hamidatu Ulya, M.Sc
NIDT. 19900906 201802021 2 239**

**Mengetahui,
Ketua Program Studi**



**Rachmawati Ningsih, M.Si
NID. 19810801 200801 2 010**

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI DAN FITOKIMIA FRAKSI
n-HEKSANA, ETIL ASETAT, DAN AIR HASIL HIDROLISIS EKSTRAK
METANOL DAUN BELUNTAS (*Pluchea indica* L.) TERHADAP BAKTERI
*Staphylococcus aureus***

SKRIPSI

Oleh:
AGNES FEBRIA SANDI
NIM. 17630041

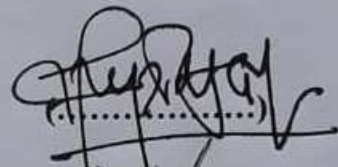
Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi dan
Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan untuk
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: 24 Mei 2022

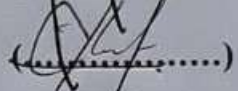
Penguji Utama : Dr. Anton Prasetyo, M.Si.
NIP. 19770925 200604 1 003

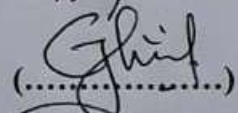
Ketua Penguji : Ahmad Hanapi, M.Sc.
NIP. 19851225 20160801 1 069

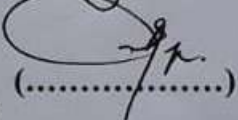
Sekretaris Penguji : A. Ghanaim Fasya, M.Si.
NIP. 19820616 200604 1 002

Anggota Penguji : Lulu'atul Hamidatu Ulya, M.Sc.
NIDT. 19900906 201802021 2 239


(.....)


(.....)


(.....)


(.....)

Mengetahui,
Ketua Program Studi



Rachmawati Ningsih, M.Si
NIP. 19810811 200801 2 010

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Agnes Febria Sandi
NIM : 17630041
Jurusan : Kimia
Fakultas : Sains dan Teknologi
Judul Penelitian : Uji Aktivitas Antibakteri Dan Fitokimia Fraksi *n*-Heksana, Etil Asetat, Dan Air Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Daun Beluntas (*Pluchea Indica* L.) Terhadap Bakteri *Staphylococcus Aureus*

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila ini dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 20 Mei 2022

Yang membuat pernyataan,



Agnes Febria Sandi

PERSEMBAHAN

Alhamdulillahirobbil alamain, dengan penuh syukur kepada Allah Swt. Yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang. Atas kuasa dan segala hal yang ditakdirkan untuk saya sehingga bisa menjadi pribadi yang lebih kuat dalam berfikir, berfikir, serta bersabar menerima segala nikmat dan karunia yang telah Engkau berikan. Salah satunya mampu melewati studi Sarjana ini hingga memperoleh gelar sarjana sebagai langkah untuk menjadi pribadi yang lebih bertanggung jawab dan lebih mandiri, serta lebih taat dan mendekatkan diri kepada Allah Swt.

Karya sederhana ini saya persembahkan kepada kedua orang tua saya, yaitu Bapak Saiful Hadi, dan Ibu Diana Mu'tamaroh yang setiap waktu menyelipkan doa untuk kelancaran dan keberhasilan putri kecilnya sebagai ridho atas segala takdir yang telah diberikan oleh-Nya dalam usaha dan kerja keras di setiap perjalanan putrinya hingga mampu mencapai titik ini.

Segala perjuangan saya hingga titik ini tak lepas dari dukungan dan semangat dari patner duniawi saya yaitu Berliana, Sakina, Safira, dan Arni yang telah memberikan telinga, hati, pelukan, pundak, canda tawa, kesabaran, *support* dan kepercayaan diri dalam menjalani setiap cobaan khususnya pada skripsi kali ini. Segala macam hal tersebut yang menjadikan saya lebih kuat dan bersyukur dikelilingi orang yang sayang dengan saya, serta beruntungnya saya diberikan rasa nyaman selama studi ini berupa rumah kedua untuk berbagi banyak hal dalam pahitnya hidup dan senangnya hidup dalam kebersamaan sederhana dengan berbagi cerita hidup yang telah dilewati bersama-sama.

Semangat juang saya tidak lepas dari saudara Ilham Ma'ruf Ersanto S.Pd. yang selalu meluangkan waktu untuk menyiapkan telinga, pundak, dan hati, serta semangat dan motivasi atas segala cerita *struggle* dalam karya ini. Terima kasih atas segala bentuk *support* dalam *healing* ataupun *deep talk* yang telah diberikan.

Hal terpenting yang tidak akan dilupakan ialah terima kasih kepada diri sendiri yang mampu melewati semua perjalanan naik turun dan berkelok-kelok, yang kuat atas segala cobaan yang ada, yang hampir patah semangat namun tetap harus kuat, yang mulai tertekan namun harus terselesaikan. Terima kasih banyak kepada kaki yang mampu menopang tubuh ini hingga tegak berdiri dengan kokoh, hati yang luas akan rasa memaafkan diri dan sabar menerima fakta yang menyayat hati, telinga dan mata yang tegar mendengar dan melihat pahitnya jalan menuju kesuksesan serta mampu menerima kritik, saran dan motivasi sehingga mampu berdiri lagi dan lagi diatas pijakan kaki yang berduri, serta organ satu ini yang luar biasa kemampuannya untuk dipaksa terus menerus memikirkan solusi yang terbaik yaitu otak yang merupakan ciptaan-Nya yang patut saya syukuri.

MOTTO

“Beda manusia, beda cerita, dan beda takdir. Manusia diciptakan sesuai dengan porsi masing-masing. Menerima segala sesuatu yang terjadi saat ini, esok hari dan yang akan datang dengan lapang hati. InsyaAllah buah kesabaran yang kita tanam akan berbuah hasil pada waktunya kelak.”

لَا يُكَلِّفُ اللَّهُ نَفْسًا إِلَّا وُسْعَهَا

“Allah tidak membebani seseorang melainkan sesuai dengan kesanggupannya”
(Q. S. Al-Baqarah: 286)

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah Swt. Yang telah memberikan rahmat, taufik, hidayah, dan inayah-Nya. Solawat serta salam penulis haturkan kepada Nabi Muhammad saw, yang telah membimbing kita menuju jalan kebenaran yaitu agama Islam, sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi berjudul “**Uji Aktivitas Antibakteri dan Fitokimia Fraksi *n*-Heksana, Etil Asetat, dan Air Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Daun Beluntas (*Pluchea indica* L.) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*”**. Penulisan skripsi ini dapat berjalan baik atas dukungan partisipasi berbagai pihak. Penulis menyampaikan rasa hormat dan terima kasih kepada:

1. Bapak Prof. Dr. M. Zainuddin, M.A., selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Ibu Dr. Sri Harini, M.Si., selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi
3. Ibu Rachmawati Ningsih, M. Si, selaku ketua program studi Kimia
4. Bapak A. Ghanaim Fasya, M.Si., selaku dosen pembimbing yang telah memberikan bimbingan, arahan, dan motivasi dalam penyusunan skripsi ini.
5. Ibu Lu'luatul Hamidatu Ulya M.Sc., selaku pembimbing agama saya yang telah memberikan ilmu dan nasehat hingga selesainya skripsi ini.
6. Seluruh dosen dan staf Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi
7. Kedua orang tua saya yang selalu memberikan doa, motivasi dan semangat untuk menuntut ilmu.
8. Rekan-rekan penelitian di tim organik khususnya tim daun beluntas, biokimia dan teman Angkatan 2017 terutama kimia B yang telah memberikan dukungan dan motivasi.

Terlepas dari semua itu, penulis menyadari sepenuhnya bahwa masih jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu, dengan tangan terbuka penulis menerima segala saran dan kritik dari pembaca agar penulis dapat lebih baik lagi dalam penulisan skripsi maupun karya tulis lainnya.

Malang, 20 Mei 2022

Penulis

DAFTAR ISI

| | |
|---|--------------|
| HALAMAN JUDUL | i |
| HALAMAN PENGESAHAN..... | ii |
| HALAMAN PERSETUJUAN | iii |
| PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN | iv |
| PESEMBAHAN | v |
| MOTTO | vi |
| KATA PENGANTAR..... | vii |
| DAFTAR ISI..... | viii |
| DAFTAR LAMPIRAN | xi |
| DAFTAR GAMBAR..... | xii |
| DAFTAR TABEL | xiv |
| ABSTRAK | xvi |
| ABSTRACT | xvii |
| مستخلص البحث..... | xviii |
| | |
| BAB I PENDAHULUAN..... | 1 |
| 1.1 Latar Belakang | 1 |
| 1.2 Rumusan Masalah..... | 5 |
| 1.3 Tujuan Penelitian | 6 |
| 1.4 Batasan Penelitian..... | 6 |
| 1.5 Manfaat Penelitian | 7 |
| | |
| BAB II TINJAUAN PUSTAKA..... | 8 |
| 2.1 Daun Beluntas (<i>Pluchea Indica L.</i>) | 8 |
| 2.2 Ekstraksi Senyawa Aktif..... | 10 |
| 2.3 Hidrolisis Glikosida | 12 |
| 2.4 Partisi (Ekstraksi Cair-Cair)..... | 13 |
| 2.5 Identifikasi Senyawa Aktif | 15 |
| 2.5.1 Steroid..... | 15 |
| 2.5.2 Triterpenoid | 16 |
| 2.5.3 Flavonoid..... | 17 |
| 2.5.4 Saponin | 18 |
| 2.5.5 Tanin..... | 19 |
| 2.5.6 Alkaloid..... | 20 |
| 2.6 Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA) | 21 |
| 2.7 Identifikasi Senyawa Aktif Menggunakan Spektroskopi UV-Vis..... | 24 |
| 2.8 Analisis Gugus Fungsi Senyawa Aktif Menggunakan FT-IR | 25 |
| 2.9 Uji Aktivitas Antibakteri | 26 |
| 2.9.1 Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> | 28 |
| 2.9.2 Pertumbuhan Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> | 30 |
| 2.10 Pemanfaatan Daun Beluntas (<i>Pluchea Indica L.</i>) dalam Perspektif Islam..... | 32 |
| | |
| BAB III METODE PENELITIAN | 36 |
| 3.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan Penelitian | 36 |
| 3.2 Alat dan Bahan..... | 36 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2.1 Alat | 36 |
| 3.2.2 Bahan | 36 |
| 3.3 Rancangan Penelitian | 37 |
| 3.4 Tahapan Penelitian | 38 |
| 3.5 Cara Kerja | 38 |
| 3.5.1 Preparasi Sampel | 38 |
| 3.5.2 Penentuan Kadar Air | 39 |
| 3.5.3 Ekstraksi Sampel | 39 |
| 3.5.4 Hidrolisis dan Ekstraksi Cair-Cair | 40 |
| 3.5.5 Uji Fitokimia Senyawa Metabolit Sekunder | 41 |
| 3.5.5.1 Uji Steroid dan Triterpenoid | 41 |
| 3.5.5.2 Uji Flavonoid | 42 |
| 3.5.5.3 Uji Saponin | 42 |
| 3.5.5.4 Uji Tanin | 42 |
| 3.5.5.5 Uji Alkaloid | 42 |
| 3.5.6 Uji Senyawa Aktif dengan Kromatografi Lapis Tipis Analitik | 42 |
| 3.5.7 Identifikasi Senyawa Menggunakan Spektroskopi UV-Vis | 43 |
| 3.5.8 Identifikasi Gugus Fungsi Menggunakan Spektroskopi IR | 43 |
| 3.5.9 Uji Antibakteri | 44 |
| 3.5.9.1 Sterilisasi Alat | 44 |
| 3.5.9.2 Pembuatan Media <i>Nutrient Agar</i> (NA) | 44 |
| 3.5.9.3 Pembuatan Media <i>Nutrient Borth</i> (NB) | 44 |
| 3.5.9.4 Peremajaan Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> | 45 |
| 3.5.9.5 Pembuatan Inokulum Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> | 45 |
| 3.5.9.6 Uji Aktivitas Antibakteri | 45 |
| 3.5.10 Analisis data | 46 |
| BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN | 48 |
| 4.1 Preparasi Sampel | 48 |
| 4.2 Penentuan Kadar Air | 49 |
| 4.3 Ekstraksi Sampel | 50 |
| 4.4 Hidrolisis | 51 |
| 4.5 Ekstraksi Cair-Cair | 52 |
| 4.6 Uji Fitokimia Senyawa Metabolit Sekunder | 53 |
| 4.6.1 Steroid dan Triterpenoid | 54 |
| 4.6.2 Flavonoid | 56 |
| 4.6.3 Saponin | 57 |
| 4.6.4 Tanin | 58 |
| 4.6.5 Alkaloid | 59 |
| 4.7 Uji Senyawa Aktif dengan Kromatografi Lapis Tipis Analitik | 61 |
| 4.8 Identifikasi Senyawa Menggunakan Spektroskopi UV-Vis | 69 |
| 4.9 Identifikasi Gugus Fungsi Menggunakan Spektroskopi IR | 72 |
| 4.10 Uji Aktivitas Antibakteri | 75 |
| 4.11 Pemanfaatan Daun Beluntas (<i>Pluchea Indica</i> L.) dalam Perspektif Islam | 83 |
| BAB V PENUTUP | 86 |
| 5.1 Kesimpulan | 86 |

| | |
|-----------------------------|------------|
| 5.2 Saran | 86 |
| DAFTAR PUSTAKA | 87 |
| LAMPIRAN..... | 104 |

DAFTAR LAMPIRAN

| | |
|---|-----|
| Lampiran 1. Rancangan Penelitian..... | 104 |
| Lampiran 2. Skema Kerja..... | 105 |
| Lampiran 3. Perhitungan | 112 |
| Lampiran 4. Data Pengamatan dan Hasil Perhitungan..... | 115 |
| Lampiran 5. Hasil Identifikasi dan Perhitungan Nilai R_f KLTA | 118 |
| Lampiran 6. Hasil Identifikasi Instrumen UV-Vis dan FTIR | 131 |
| Lampiran 7. Data Uji Aktivitas Antibakteri | 136 |
| Lampiran 8. Dokumentasi | 138 |

DAFTAR GAMBAR

| | | |
|--------------|---|-----|
| Gambar 2.1 | Daun beluntas (<i>Pluchea indica</i> L.)..... | 9 |
| Gambar 2.2 | Dugaan reaksi hidrolisis ikatan <i>O</i> -glikosida | 13 |
| Gambar 2.3 | Struktur steroid | 16 |
| Gambar 2.4 | Struktur isoprene | 17 |
| Gambar 2.5 | Struktur flavonoid..... | 18 |
| Gambar 2.6 | Struktur inti senyawa saponin | 19 |
| Gambar 2.7 | Struktur inti senyawa tanin | 20 |
| Gambar 2.8 | Struktur inti alkaloid..... | 21 |
| Gambar 2.9 | Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> | 29 |
| Gambar 2.10 | Grafik pertumbuhan bakteri | 30 |
| Gambar 2.11 | Kurva pertumbuhan bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> | 31 |
| Gambar 4.1 | Reaksi HCl dan natrium bikarbonat (NaHCO ₃) | 51 |
| Gambar 4.2 | Dugaan reaksi uji senyawa steroid | 55 |
| Gambar 4.3 | Dugaan reaksi uji senyawa triterpenoid | 56 |
| Gambar 4.4 | Dugaan reaksi uji senyawa flavonoid..... | 57 |
| Gambar 4.5 | Dugaan reaksi uji senyawa saponin..... | 58 |
| Gambar 4.6 | Dugaan reaksi uji senyawa tanin | 59 |
| Gambar 4.7 | Dugaan reaksi uji alkaloid preaksi Dragendorff..... | 60 |
| Gambar 4.8 | Dugaan reaksi uji alkaloid pereaksi Mayer | 60 |
| Gambar 4.9 | Hasil KLTA senyawa steroid dan terpenoid ekstrak metanol (m), fraksi etil asetat (ea), fraksi <i>n</i> -heksana (n-h), dan fraksi air (a) daun beluntas | 63 |
| Gambar 4.10 | Hasil KLTA senyawa flavonoid ekstrak metanol (m), fraksi etil asetat (ea), fraksi <i>n</i> -heksana (n-h), dan fraksi air (a) daun beluntas..... | 64 |
| Gambar 4.11 | Hasil KLTA senyawa tanin ekstrak metanol (m), fraksi etil asetat (ea), fraksi <i>n</i> -heksana (n-h), dan fraksi air (a) daun beluntas..... | 65 |
| Gambar 4.12 | Hasil KLTA senyawa saponin ekstrak metanol (m), fraksi etil asetat (ea), fraksi <i>n</i> -heksana (n-h), dan fraksi air (a) daun beluntas..... | 66 |
| Gambar 4.13 | Hasil KLTA senyawa alkaloid ekstrak metanol (m), fraksi etil asetat (ea), fraksi <i>n</i> -heksana (n-h), dan fraksi air (a) daun beluntas..... | 68 |
| Gambar 4.14 | Spektra UV-Vis daun beluntas | 69 |
| Gambar 4.15 | Spektra FTIR daun beluntas | 72 |
| Gambar 4.16 | Zona hambat ekstrak metanol daun beluntas..... | 77 |
| Gambar 4.17 | Zona hambat fraksi air daun beluntas..... | 78 |
| Gambar 4.18 | Zona hambat fraksi etil asetat daun beluntas..... | 79 |
| Gambar 4.19 | Zona hambat pada fraksi <i>n</i> -heksana daun beluntas | 79 |
| Gambar 4.20 | Zona hambat larutan kontrol daun beluntas | 80 |
| Gambar L.7.1 | Hasil identifikasi instrumen Uv-Vis | 131 |
| Gambar L.7.2 | Hasil identifikasi instrument FTIR | 134 |
| Gambar L.8.1 | Preparasi daun beluntas | 138 |
| Gambar L.8.2 | Analisis kadar air | 138 |
| Gambar L.8.3 | Maserasi | 138 |

| | |
|---|-----|
| Gambar L.8.4 Hidrolisis dan partisi | 138 |
| Gambar L.8.5 Uji Fitokimia | 139 |
| Gambar L.8.6 KLTA | 139 |
| Gambar L.8.7 Uji antibakteri | 139 |

DAFTAR TABEL

| | | |
|---------------|---|-----|
| Tabel 2.1 | Warna dan dugaan senyawa pada lampu UV-Vis | 22 |
| Tabel 2.2 | Warna dan warna komplementer | 25 |
| Tabel 2.3 | Panjang gelombang inframerah | 26 |
| Tabel 3.1 | Aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi dengan variasi konsentrasi | 37 |
| Table 3.2 | Kategori diameter zona hambat | 46 |
| Tabel 4.1 | Hasil kadar air daun beluntas | 49 |
| Tabel 4.2 | Hasil partisi dan rendemen fraksi | 52 |
| Tabel 4.3 | Uji fitokimia ekstrak dan fraksi daun beluntas | 53 |
| Tabel 4.4 | Interpretasi spektra FTIR ekstrak dan fraksi daun beluntas | 73 |
| Tabel 4.5 | Hasil uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> | 77 |
| Tabel 4.6 | Hasil uji beda nyata terkecil (BNt) variasi pelarut terhadap zona hambat | 82 |
| Tabel 4.7 | Hasil uji beda nyata terkecil (BNt) variasi konsentrasi terhadap zona hambat | 83 |
| Tabel L.4.1 | Data berat cawan kosong | 115 |
| Tabel L.4.2 | Data berat cawan kosong + sampel | 115 |
| Tabel L.4.3 | Rendemen ekstrak metanol daun beluntas | 116 |
| Tabel L.4.4 | Data hasil rendemen fraksi daun beluntas | 117 |
| Tabel L.5.1 | Data penampakan noda dugaan senyawa steroid dan triterpen ekstrak dan fraksi daun beluntas dengan variasi eluen | 118 |
| Tabel L.5.1.1 | Hasil KLTA senyawa steroid eluen <i>n</i> -heksana:etil asetat (8:2) | 118 |
| Tabel L.5.1.2 | Hasil KLTA senyawa steroid eluen <i>n</i> -heksana:etil asetat (6:4) | 120 |
| Tabel L.5.1.3 | Hasil KLTA senyawa triterpenoid eluen <i>n</i> -heksana:etil asetat (15:5) | 121 |
| Tabel L.5.1.4 | Hasil KLTA senyawa triterpenoid eluen <i>n</i> -heksana:etil asetat (17:3) | 122 |
| Tabel L.5.2 | Data penampakan noda dugaan senyawa flavonoid ekstrak dan fraksi daun beluntas dengan variasi eluen | 123 |
| Tabel L.5.2.2 | Hasil KLTA senyawa flavonoid eluen <i>n</i> -butanol:asam asetat:air (4:1:5) | 123 |
| Tabel L.5.2.3 | Hasil KLTA senyawa flavonoid eluen kloroform:metanol (7:3) | 124 |
| Tabel L.5.3 | Data penampakan noda dugaan senyawa tanin ekstrak dan fraksi daun beluntas dengan variasi eluen | 125 |
| Tabel L.5.3.1 | Hasil KLTA senyawa tanin eluen <i>n</i> -heksana:etil asetat (19:1) | 125 |
| Tabel L.5.2.3 | Hasil KLTA senyawa tanin eluen <i>n</i> -heksana:etil asetat (6:4) .. | 126 |
| Tabel L.5.3.2 | Hasil KLTA senyawa tanin eluen <i>n</i> -butanol:asam asetat:air (4:1:5) | 127 |
| Tabel L.5.4 | Data penampakan noda dugaan senyawa saponin ekstrak dan fraksi daun beluntas dengan variasi eluen | 127 |
| Tabel L.5.4.1 | Hasil KLTA senyawa saponin eluen kloroform:metanol:air (19:1) | 128 |
| Tabel L.5.4.2 | Hasil KLTA senyawa tanin eluen <i>n</i> -heksana:etil asetat (8:2) .. | 129 |
| Tabel L.5.5 | Data penampakan noda dugaan senyawa alkaloid ekstrak dan | |

| | | |
|---------------|--|-----|
| | fraksi daun beluntas dengan variasi eluen | 129 |
| Tabel L.5.5.1 | Hasil KLTA senyawa alkaloid eluen kloroform:metanol (9:1) | 130 |
| Tabel L.5.5.2 | Hasil KLTA senyawa alkaloid eluen kloroform:metanol (2:8) | 130 |
| Tabel L.6.1 | Hasil zona hambat ekstrak metanol daun beluntas | 136 |
| Tabel L.6.2 | Hasil zona hambat fraksi air daun beluntas | 136 |
| Tabel L.6.3 | Hasil zona hambat fraksi etil asetat daun beluntas | 136 |
| Tabel L.6.4 | Hasil zona hambat fraksi <i>n</i> -heksana daun beluntas | 136 |
| Tabel L.6.5 | <i>Dependent variable</i> zona hambat | 137 |
| Tabel L.6.6 | <i>Homogenius subsets</i> pelarut | 137 |
| Tabel L.6.7 | <i>Homogenius subsets</i> konsentrasi | 137 |

ABSTRAK

Sandi, Agnes Febria. 2022. **Uji Aktivitas Antibakteri dan Fitokimia Fraksi n-Heksana, Etil Asetat, dan Air Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Daun Beluntas (*Pluchea indica* L.) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus***. Skripsi. Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing I: A. Ghanaim Fasya, M.Si. Pembimbing II: Lulu'atul Hamidatu Ulya, M.Sc.

Kata Kunci : *Pluchea indica* L., Antibakteri, *Staphylococcus aureus*, Difusi Cakram.

Daun beluntas (*Pluchea indica* L.) merupakan tanaman pagar yang hidup di daerah tanah kering serta dimanfaatkan sebagai jamu tradisional dan lalapan. Daun beluntas (*Pluchea indica* L.) memiliki senyawa aktif yang bersifat antioksidan, antibakteri, anti inflamasi dan antiseptik. Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air hasil hidrolisis ekstrak metanol daun beluntas (*Pluchea indica* L.) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, serta mengetahui golongan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam fraksi atau ekstrak metanol daun beluntas.

Ekstrak senyawa aktif daun beluntas (*Pluchea indica* L.) diperoleh dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol. Ekstrak metanol pekat dihidrolisis dengan HCl 2N dan dinetralkan dengan NaHCO₃, hidrosilat diekstraksi cair-cair bertingkat menggunakan variasi pelarut yaitu *n*-heksana, etil asetat, dan air. Uji aktivitas antibakteri menggunakan *Staphylococcus aureus* dengan metode difusi agar. Hasil ekstrak dan fraksi dilanjutkan pada uji aktivitas antibakteri dengan variasi konsentrasi 5, 10, 15, 20, dan 25%. Kemudian ekstrak atau fraksi diuji fitokimia dan senyawa dipisahkan dengan KLT. Senyawa aktif diidentifikasi menggunakan spektroskopi UV-Vis dan gugus fungsinya menggunakan spektroskopi IR.

Hasil dari uji aktivitas antibakteri menunjukkan fraksi etil asetat mempunyai aktivitas antibakteri tertinggi dengan zona hambat tertinggi 6,6 mm, fraksi air zona hambat yang diperoleh 6,3 mm, ekstrak metanol memiliki zona hambat sebesar 6,1 mm, dan fraksi *n*-heksana tidak memberikan zona hambat terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Hasil identifikasi senyawa aktif pada daun beluntas menunjukkan adanya senyawa steroid, terpenoid, flavonoid, tanin, saponin, dan alkaloid.

ABSTRACT

Sandi, Agnes Febria. 2022. **Antibacterial and Phytochemical Activity Test of n-Hexane, Ethyl Acetate, and Water Fractions from the Hydrolysis Methanol Extract of Beluntas Leaves (*Pluchea indica* L.) against *Staphylococcus aureus* Bacteria.** Thesis. Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Maulana Malik Ibrahim State Islamic University of Malang. Advisor I: A. Ghanaim Fasya, M.Si. Advisor II: Lulu'atul Hamidatu Ulya, M.Sc.

Keywords: *Pluchea indica* L., Antibacterial, *Staphylococcus aureus*, Disc Diffusion.

Beluntas leaves (*Pluchea indica* L.) are hedge plants that live in dry land areas and are used as traditional herbs and vegetables. Beluntas leaves (*Pluchea indica* L.) have active compounds that are antioxidant, antibacterial, anti-inflammatory and antiseptic. This research was conducted with the aim of knowing the antibacterial activity of the *n*-hexane, ethyl acetate, and water fractions resulting from the hydrolysis of the methanol extract of beluntas leaves (*Pluchea indica* L.) against *Staphylococcus aureus* bacteria, as well as knowing of the secondary metabolite compounds contained in the methanol fraction or extract of beluntas leaves.

The active compound extract of beluntas leaves (*Pluchea indica* L.) was obtained by maceration method using methanol as a solvent. The concentrated methanol extract was hydrolyzed with 2N HCl and neutralized with NaHCO₃, the hydrolysate was extracted liquid-stratified using a variety of solvents, namely *n*-hexane, ethyl acetate, and water. Antibacterial activity test used the *Staphylococcus aureus* with the agar diffusion method. The results of the extract and fraction were continued in the antibacterial activity test by various concentration of 5, 10, 15, 20, and 25%. Then the extract or fraction was tested for phytochemicals and the compounds were separated by TLC. The active compounds were identified using UV-Vis spectroscopy and their functional groups using IR spectroscopy.

The results of the antibacterial activity test showed that the ethyl acetate fraction had the highest antibacterial activity with the highest inhibition zone of 6.6 mm, the water fraction of the inhibition zone obtained was 6.3 mm, the methanol extract had an inhibition zone of 6.1 mm, and the *n*-hexane fraction was not provided a zone of inhibition against *Staphylococcus aureus* bacteria. The results of the identification of active compounds in beluntas leaves showed the presence of steroid compounds, terpenoids, flavonoids, tannins, saponins, and alkaloids.

مستخلص البحث

ساندي، أغنيس فريا. ٢٠٢٠. اختبار النشاط مضاد للجراثيم وكيمياء النبات من جزء ن-هكسان، إيثيل أسيتات وماء التحلل المائي خلاصة ميثانول ورقة بيلونتاس (بلوسا إنديكال). على الجرثوم ستافيلوكوكوس أوريبوس. إقتراح. قسم الكيمياء، كلية العلوم والتكنولوجيا، جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج. المشرف الأولى: أ. غنائم فشا، الماجستير. المشرف الثاني: لؤلؤة الحمدة الأولى، الماجستير.

الكلمات الرئيسية: بلوسا إنديكال، مضاد للجراثيم، ستافيلوكوكوس أوريبوس، انتشار القرص.

ورقة البيلونتاس (بلوسا إنديكال) هو نبات التحوط يعيش في مناطق جافة ويستخدم كأدوية عشبية تقليدية وخضروات طازجة. ورقة البيلونتاس (بلوسا إنديكال) يحتوي على مركبات نشطة مضادة للأكسدة ومضادة للجراثيم ومضادة للالتهابات ومطهر. في هذا البحث أجريت بهدف معرفة النشاط ضدّ للجراثيم من جزء ن-هكسان، إيثيل أسيتات وماء التحلل المائي خلاصة الميثانول ورقة البيلونتاس (بلوسا إنديكال) على الجرثوم ستافيلوكوكوس أوريبوس، وكذلك معرفة فئة المستقبلات الثانوية الموجودة في جزء أو خلاصة الميثانول الذي يحتوي على أعلى نشاط مضاد للجراثيم.

خلاصة مركب النشاط ورقة بيلونتاس (بلوسا إنديكال) متناول بطريقة ميرياسي باستخدام مسيل الميثانول. مسيل الميثانول خاثر متحلل با ٢ N HCl وتحييد با NaHCO_3 ، استخلاص هيدروسيالات. السائل المتدرج باستخدام مسيل تنوع يعني، ن-هكسان، إيثيل أسيتات وماء. اختبار النشاط مضاد للجراثيم باستخدام ستافيلوكوكوس أوريبوس بطريقة ديفوسي أكار. أما نتائج الخلاصة وجزء ثم التالي في اختبار النشاط مضاد للجراثيم باختلاف التركيز ٥، ١٠، ١٥، ٢٠، و ٢٥%. ثم خلاصة وجزء اختبار بكيمياء النبا ومستحضر مقسم با KLT. مستحضر ناشط تُعرّف باستخدام سفكتروسكوبي UV-Vis وعنقود وظيفته باستخدام سفكتروسكوبي IR.

نتائج من اختبار النشاط مضاد للجراثيم أشار إلى جزء إيثيل أسيتات والنشاط مضاد للجراثيم أعلى منطقة التثبيط ٦,٦ ملم، جزء الماء حصلت على منطقة التثبيط ٦,٣ ملم، يحتوي خلاصة الميثانول على منطقة التثبيط ٦,١ ملم، وجزء ن-هكسان لا تعطي منطقة التثبيط للجراثيم ستافيلوكوكوس أوريبوس. تعرّف وكيمياء النبات خلاصة وجزء ورقة بيلونتاس أشار إلى موجود مستحضر ستروثيت، ترفينوئيت، فلافونوئيت، تانين، سافونين، ألكالوئيت.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia memiliki banyak jenis tanaman yang dapat dibudidayakan karena bermanfaat dan kegunaannya besar bagi manusia dalam hal pengobatan. Penggunaan tanaman sebagai bahan obat tradisional memerlukan penelitian ilmiah untuk mengetahui kebenaran khasiatnya. Penggunaan tanaman sebagai obat dapat dijamin kebenarannya dengan didapatkan data yang meyakinkan secara ilmiah (Widowati, 1997).

Dalam perkembangan ilmu seperti saat ini, banyak tumbuhan yang terbukti secara ilmiah bisa mengobati berbagai penyakit yang disebabkan adanya kandungan yang terdapat dalam tumbuhan. Hal ini merupakan salah satu bukti kekuasaan Allah Swt. Sebagaimana dalam firman Allah Swt. dalam al-Qur'an Surat Yunus (10) ayat 24:

إِنَّمَا مَثَلُ الْحَيَاةِ الدُّنْيَا كَمَاءٍ أَنْزَلْنَاهُ مِنَ السَّمَاءِ فَاخْتَلَطَ بِهِ نَبَاتُ الْأَرْضِ مِمَّا يَأْكُلُ النَّاسُ وَالْأَنْعَامُ

Artinya : *“Sesungguhnya perumpamaan kehidupan duniawi itu, adalah seperti air (hujan) yang Kami turunkan dari langit, lalu tumbuhlah dengan subur karena air itu tanaman-tanaman bumi, di antaranya ada yang dimakan manusia dan binatang ternak.”*

Ayat tersebut menjelaskan bahwa kehidupan di dunia diumpamakan sebagai air yang dijatuhkan dari langit dan ditumbuhkan berbagai jenis tumbuhan subur. Imani (2008) dalam tafsir Nurul Qur'an menjelaskan bahwa Allah dengan kekuasaan-Nya telah menurunkan rahmat berupa hujan dari langit sehingga

terciptalah aliran air yang baik di atas tanah (sungai) maupun di bawah tanah, yang menjadi tempat tumbuhnya berbagai tumbuhan sehingga tumbuhlah menjadi subur. Sebagian dari tumbuhan itu bermanfaat bagi makhluk hidup lainnya seperti manusia dan binatang, salah satunya dengan cara dimakan. Aneka jenis bentuk, dan rasa dari berbagai tumbuhan merupakan hal-hal yang sungguh memukau dan menandakan betapa besar kuasa pencipta-Nya. Allah Swt. menciptakan bermacam-macam tumbuhan untuk memenuhi kebutuhan manusia.

Kehidupan manusia tidak lepas dari pengobatan secara tradisional salah satunya menggunakan daun beluntas. Daun beluntas (*Pluchea indica* L.) termasuk family *Asteraceae* yang dimanfaatkan sebagai sayuran dengan cara dilalap atau dimasak sebagai penambah nafsu makan, dan air seduhan daunnya dipakai sebagai jamu penghilang bau badan, gangguan pencernaan, nyeri rematik atau sakit pinggang, demam, dan nyeri haid (Ardiansyah, 2003). Penyakit yang sering menginfeksi manusia disebabkan oleh interaksi dengan mikroorganisme. Terdapat dua jenis interaksi mikroorganisme yaitu bersifat menguntungkan dan merugikan (patogen) (Ardiansyah, 2019). Salah satu yang termasuk ke dalam mikroorganisme adalah bakteri. *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri patogen penyebab penyakit tertentu pada manusia. Termasuk dalam bakteri gram positif penyebab peradangan pada kulit, infeksi saluran pernafasan, abses, keracunan makanan (Wikananda, 2019), serta dapat menyebabkan bau badan (Lailiyah, 2019).

Pada saat ini, obat tradisional dipilih untuk mengobati penyakit tertentu salah satunya ialah bau badan. Bau badan merupakan masalah yang cukup penting dan dapat mengganggu aktivitas seseorang. Menurut Wijayakusuma (2008) dalam Chandra (2017), bau badan dapat terjadi karena kurang menjaga kebersihan badan

dan adanya bakteri yang menguraikan keringat menjadi zat yang kurang sedap. Penggunaan bahan alam sebagai obat tradisional khususnya antibakteri mempunyai tujuan penting yaitu untuk mengurangi penggunaan bahan kimia yang berakibat pada resistensi obat serta memiliki kelebihan dibandingkan dengan antibakteri sintesis, karena mudah didapatkan dan efek samping yang ditimbulkan terhadap kesehatan umumnya relatif kecil.

Salah satu tumbuhan yang mengandung senyawa obat adalah tanaman beluntas. Tumbuhan ini sering disebut sebagai tanaman pagar serta mudah ditemukan di Indonesia (Koirewoa, dkk., 2014). Hal ini disebabkan adanya kandungan senyawa fitokimia dalam daun beluntas. Senyawaan fitokimia pada tanaman dapat diekstrak dengan pelarut yang sesuai dengan tingkat kepolarannya. Pada umumnya terdapat gugus hidroksil pada senyawa fenolik menyebabkan senyawa ini bersifat polar yang dapat terekstrak oleh pelarut polar. Metanol secara efektif dapat mengekstrak senyawa polar seperti flavonoid, antosianin, terpenoid, saponin, tanin, fenon, dan polifenol. Air dapat mengekstrak senyawa sangat polar, seperti glikosida, asam amino, dan gula, aglikon, antosianin, pati, tanin, saponin, terpenoid. *n*-Heksana dapat mengekstrak senyawa polar, seperti glikosida, aglikon, dan gula sedangkan etil asetat dilaporkan dapat mengekstrak senyawa alkaloid, aglikon, dan glikosida, sterol, terpenoid, dan flavonoid (Widyawati, 2012).

Pada penelitian Elvina (2018) menggunakan fraksi pada ekstraksi cair-cair berupa *n*-heksana, etil asetat, dan air pada uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun sirih. Pelarut etanol dengan fraksi *n*-Heksana dan fraksi yang terakhir menggunakan etil asetat. Menunjukkan zona hambat pada konsentrasi 20 µg/disk *n*-heksana rata-rata 8,1 mm, etil asetat 8,5 mm, air sebesar 6,1 mm dan metanol 7,4

mm. Sehingga dapat diketahui bahwa senyawa yang terkandung dalam ekstrak ekstrak etanol daun sirih lebih banyak mengandung senyawa yang bersifat polar, serta organoleptis fraksi *n*-heksana berwarna kehijauan, fraksi etil asetat berwarna hijau tua dan fraksi air berwarna cokelat tua.

Senyawa metabolit sekunder pada daun beluntas yang terkandung seperti alkaloid, flavonoid, steroid, dan tanin. Sedangkan pada akar beluntas mengandung senyawa flavonoid dan tanin (Muta'ali, 2015). Kandungan senyawa dalam daun beluntas memiliki beberapa aktivitas biologis yaitu sebagai antimalaria (Putra, 2017), anti inflamasi dan antipiretik (Fitriansyah, 2018), antidiabetes dan antimikroba (Muharni, dkk., 2017). Metabolit sekunder dalam bidang pengobatan memiliki aktivitas yang berbeda-beda. Pada tanaman beluntas terdapat senyawa aktif yang memiliki aktivitas antibakteri diantaranya tanin, flavonoid, dan alkaloid (Farhamzah, 2021). Penelitian lain oleh Ardiansyah, dkk. (2003), diketahui bahwa terdapat senyawa aktif yang diduga berperan sebagai senyawa antimikroba pada ekstrak daun beluntas. Diduga ekstrak daun beluntas mampu bereaksi dengan membran sel bakteri. Salah satu bakteri yang sensitif adalah *Staphylococcus aureus*. Pengaruh zona hambat terhadap aktivitas antimikroba ekstrak daun beluntas bervariasi tergantung pada konsentrasi dan bakteri uji.

Menurut Manu (2013) menyatakan hasil uji ekstrak etanol daun beluntas terhadap *Staphylococcus aureus* dengan variasi konsentrasi 12, 24, 36, 48, dan 60 % memberikan diameter hambatan terbesar terhadap pada konsentrasi 60% sebesar 1,593 cm. Hasil ekstrak etanol daun pepaya dengan variasi konsentrasi 10, 20 dan 30% menunjukkan daerah zona hambat terbesar pada konsentrasi 30% dengan zona hambat 12,6 mm, sedangkan hasil fraksi ekstrak metanol daun pepaya terhadap

Staphylococcus aureus pada konsentrasi 5% menunjukkan zona hambat *n*-heksana 12,3 mm, etil asetat 12,6 mm, dan metanol 12,0 mm (Roni, dkk., 2018). Semakin besar diameter zona hambat dari suatu senyawa uji, semakin tinggi pula aktivitas antibakteri pada senyawa tersebut. Diameter zona hambat yang dihasilkan dari ekstrak etanol daun beluntas dan meniran menunjukkan bahwa senyawa aktif dalam daun tersebut dapat menghambat aktivitas bakteri *Staphylococcus aureus* dengan variasi perbandingan konsentrasi yaitu 1:0, 2:1, 1:1, 1:2, dan 0:1. Menghasilkan zona hambat pada daun beluntas pada konsentrasi perbandingan 1:0 sebesar 8, 12, dan 13 mm (Agustin, 2018).

Berdasarkan penelitian sebelumnya, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terkait aktivitas antibakteri daun beluntas. Pada penelitian ini akan dilakukan pengujian aktivitas antibakteri ekstrak metanol daun beluntas dengan metode difusi cakram yang sebelumnya telah dilakukan uji fitokimia serta karakterisasi menggunakan instrument spektroskopi *ultra violet-visible* (UV-Vis) dan spektroskopi *infra red* (IR). Melalui penelitian ini diharapkan dapat mengetahui aktivitas antibakteri pada beluntas, serta diperoleh alternatif obat antibakteri penyebab bau badan.

1.2 Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

- a. Bagaimana aktivitas antibakteri fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air hasil hidrolisis ekstrak metanol daun beluntas (*Pluchea Indica* L.) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*?

- b. Golongan senyawa metabolit sekunder apa saja yang terdapat dalam fraksi atau ekstrak metanol daun beluntas (*Pluchea Indica L.*)?

1.3 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dalam penelitian ini adalah:

- a. Untuk mengetahui aktivitas antibakteri fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air hasil hidrolisis ekstrak metanol daun beluntas (*Pluchea Indica L.*) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.
- b. Untuk mengetahui golongan senyawa metabolit sekunder apa saja yang terdapat dalam fraksi atau ekstrak metanol daun beluntas (*Pluchea Indica L.*).

1.4 Batasan Masalah

Adapun batasan masalah dalam penelitian ini adalah:

- a. Sampel daun beluntas (*Pluchea indica L.*) dari Kedung kandang Malang.
- b. Proses ekstraksi maserasi menggunakan pelarut metanol, hidrolisis, dan ekstraksi cair-cair (partisi).
- c. Bakteri uji dengan *Staphylococcus aureus* untuk menguji aktivitas antibakteri.
- d. Senyawa metabolit sekunder meliputi senyawa steroid, flavonoid, alkaloid, terpenoid, tanin, dan saponin.
- e. Uji senyawa aktif menggunakan kromatografi lapis tipis analitik (KLTA).
- f. Identifikasi senyawa flavonoid menggunakan spektroskopi UV-Vis dan spektroskopi IR.

1.5 Manfaat Penelitian

Memberikan informasi ilmiah kepada masyarakat tentang senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada ekstrak daun beluntas sehingga dapat dijadikan sebagai bahan dasar antibakteri *Staphylococcus aureus*. Serta menjadi rujukan bagi para peneliti untuk dapat melakukan penelitian selanjutnya dengan memanfaatkan ekstrak daun beluntas sebagai obat tradisional.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Daun Beluntas (*Pluchea indica* L.)

Tumbuhan beluntas adalah tanaman perdu kecil, tumbuh tegak, tinggi mencapai ± 2 meter. Tumbuhan ini berasal dari Iranian suku *Asteraceae family* (Compositae). Namanya berbeda-beda, sesuai daerah tempat dia tumbuh. Di Sumatera dikenal dengan sebutan beluntas (Melayu), di Sunda dikenal dengan nama baluntas atau baruntas, di Jawa biasa disebut dengan luntas, di Madura dikenal dengan nama baluntas, di Makasar menyebut tumbuhan ini dengan nama *lamutasa'*, dan di Timor disebut lenabou. Beluntas biasanya disebut sebagai tanaman pagar yang hidup didaerah tanah kering, keras, dan berbatu (Koirewoa, dkk., 2012). Salah satu tumbuhan tingkat tinggi yang dapat dibedakan antara daun, batang, dan akarnya ialah tumbuhan beluntas. Beluntas merupakan tanaman semak, tumbuhan tegak, tingginya mencapai 2 meter atau lebih. Percabangan banyak, rusuknya halus, dan berbulu lembut. Tanaman beluntas berbungan sepanjang tahun.

Bunga beluntas majemuk, dan berbentuk malai rata. Bunga keluar dari ujung cabang sampai ketiak daun. Memiliki cabang bunga sangat banyak, membentuk rempuyung berkisar antara 2,5-12,5 cm. Bunga berbentuk bonggol, bergagang atau duduk. Bentuknya seperti silinder sempit (kecil) dengan panjang 5-6 mm. Memiliki panjang daun pembalut sampai 4 mm. Sedangkan daun pelindung bunga tersusun dari 6-7 helai, berbentuk sudut (lanset) yang berada didalam dan berbentuk bulat telur berada diluar. Daun berbulu lembut sebagai pelindung berwarna ungu. Kepala sari menjulur dan berwarna ungu. Tangkai putik pada bunga betina lebih panjang.

Memiliki bentuk buah longah berbentuk seperti gasing, berwarna coklat dengan tiap sudut putih, dan lokos (gundul atau lancip) panjang buah 1 mm (Pujowati, 2006).

Morfologi daun beluntas dapat dilihat pada Gambar 2.1.

Klasifikasi tanaman beluntas yang digunakan dalam penelitian ini memiliki taksonomi sebagai berikut (Dalimarta, 1999):

| | |
|--------------|------------------------------|
| Super divisi | : Spermatophyta |
| Divisi | : Magnoliophyta |
| Kelas | : Dicotyledone |
| Ordo | : Asterales |
| Famili | : Asteracease |
| Genus | : <i>Pluchea</i> |
| Spesies | : <i>Pluchea Indica</i> Less |



Gambar 2.1 Daun beluntas (*Pluchea indica* L.)

Khasiat tumbuhan beluntas salah satunya berbau khas aromatis dan rasanya getir. Bermanfaat untuk meningkatkan nafsu makan, membantu pencernaan, peluruhan keringat, pereda demam dan penyegaran. Akar beluntas berkhasiat sebagai peluruhan keringat dan penyejuk namun secara tradisional masyarakat memanfaatkan tanaman beluntas sebagai obat untuk menghilangkan bau badan, obat demam, obat batuk, obat malaria, dan obat diare. Rebusan dari daun beluntas juga sering dijadikan obat penyakit kulit dan dapat dikonsumsi sebagai lalapan (Rahayu, dkk., 2012). Kandungan kimia dalam daun beluntas meliputi alkaloid, flavonoid, tanin, minyak atsiri, natrium, kalium, aluminium, kalsium, magnesium

dan fosfor. Sedangkan akarnya mengandung flavonoid dan tanin (Susetyarini, 2007). Beluntas bekerja sebagai antibakteri yang dibuktikan dengan penghambatan pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa Multi Resistant* dan *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (Nurahmanto, 2016).

Dari manfaat di atas dalam berbagai penelitian dilakukan uji senyawa yang terkandung didalam daun beluntas terdapat berbagai senyawa antara lain lignan, terpena, fenilpropanoid, bensoid, alkana, sterol, katekin, fenol hidrokuinon, saponin, tanin, dan alkaloid. Kandungan senyawa dalam daun beluntas memiliki beberapa aktivitas biologis yaitu sebagai anti inflamasi, antipiretik, hipoglikemik, diuretik dan berbagai aktivitas farmakologi (Widiyatni, dkk., 2010). Sehingga tidak diherankan jika daun beluntas digunakan dalam terapi pengobatan radang dan antiluka, pengobatan saluran pencernaan, pengobatan sendi, serta pengobatan gangguan saluran pernafasan (Puspaningtyas, dkk., 2013).

2.2 Ekstraksi Senyawa Aktif

Ekstrak merupakan materi hasil penarikan oleh pelarut air atau pelarut organik dari bahan kering atau dikeringkan. Pelarut dari hasil penyaringan dapat dihilangkan dengan cara penguapan menggunakan alat evaporator. Pelarut organik akan menghasilkan ekstrak kental, sedangkan pelarut air didapatkan hasil serbuk yang pada tahap akhirnya menggunakan alat *freeze dryer* (Paju, dkk., 2013).

Ekstraksi merupakan suatu proses pemisahan zat aktif dari suatu padatan maupun cairan dengan menggunakan bantuan pelarut. Pemilihan pelarut diperlukan dalam proses ekstraksi, karena pelarut yang digunakan harus dapat memisahkan atau mengekstrak substansi yang diinginkan tanpa melarutkan zat-zat lainnya yang

tidak diinginkan (Prayudo, 2015). Pelarut pilihan utama untuk mengekstraksi metabolit sekunder yang belum diketahui strukturnya dan untuk tujuan skrining adalah metanol, etanol 70 dan 96%. Jika tujuannya mengisolasi dan memurnikan senyawa target dapat menggunakan pelarut organik lain seperti butanol, etil asetat, kloroform, dan *n*-Heksana (Saifuddin, 2014).

Maserasi merupakan metode yang sederhana karena tidak memerlukan peralatan yang rumit, relatif murah, dan dapat menghindari rusaknya komponen senyawa yang mudah menguap karena adanya pemanasan (Kiswando, 2011). Proses maserasi selesai ketika bahan yang diekstrak pada bagian dalam sel masuk dalam cairan dengan seimbang, sehingga berakhir proses difusi (ekstraksi). Selama proses maserasi dilakukan pengocokan berulang. Hal ini dilakukan untuk menjamin keseimbangan konsentrasi bahan ekstraksi yang lebih cepat dalam cairan (Voigh, 1994).

Proses ekstraksi maserasi menggunakan pelarut metanol. Metanol golongan alkohol yang mempunyai berat molekul rendah. Kondisi ini mempermudah pembentukan ikatan hidrogen dengan molekul air jaringan bahan yang diekstrak sehingga senyawa-senyawa dalam jaringan bahan akan mudah terkestrak. Pada penelitian Widyawati (2012), menyatakan bahwa hasil ekstrak daun beluntas menggunakan pelarut metanol memiliki nilai rendemen yang lebih besar yaitu 13,64%. Sedangkan pada pelarut etanol nilai rendemen yang dihasilkan lebih rendah sebesar 1,40%. Sehingga pelarut metanol lebih efektif dalam mengekstrak senyawa metabolit sekunder yang terdapat didalam daun beluntas. Pelarut metanol dipilih karena termasuk pelarut polar yang selektif, sehingga dengan menggunakan metanol diharapkan metabolit sekunder yang ada di dalam simplisia sebagian besar

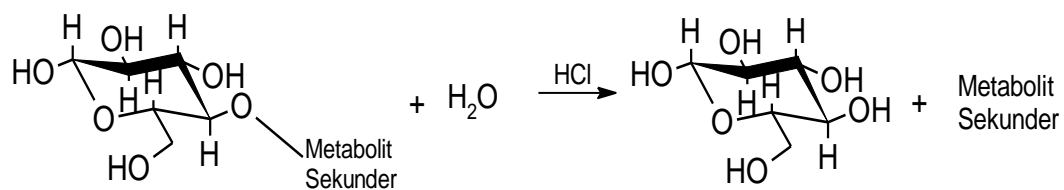
terambil dan juga pelarut metanol paling banyak digunakan dalam proses isolasi senyawa organik bahan alam (Indarto, 2019).

2.3 Hidrolisis Glikosida

Hidrolisis merupakan reaksi pemecahan senyawa kompleks menjadi senyawa yang lebih sederhana dengan bantuan air (Yusrin dan Mukaromah, 2010). Reaksi hidrolisis dilakukan untuk membebaskan aglikon pada senyawa organik yang berbentuk glikosida. Senyawa-senyawa organik dalam tanaman umumnya berbentuk glikosida, yaitu senyawa yang terdiri dari gula (glikon) dan senyawa bukan gula (aglikon) (Gunawan dan Mulyani., 2004). Ikatan glikosida yang menghubungkan glikon dan aglikon ini sangat mudah terurai oleh pengaruh asam, basa, enzim, air, dan panas (Rahayu dan Hastuti, 2008). Sifat-sifat glikosida yaitu mudah menguap dan mudah larut dalam pelarut polar seperti air, semakin panas lingkungannya maka akan semakin cepat terhidrolisis (Gunawan dan Mulyani, 2004). Untuk mendapatkan senyawa metabolit sekunder dapat dilakukan dengan pemutusan ikatan glikosida menggunakan reaksi hidrolisis (Fasya, dkk., 2020).

Katalis dibutuhkan untuk mempercepat reaksi dalam proses hidrolisis karena dengan bantuan air saja, reaksi berjalan dengan lambat. Asam kuat seperti asam klorida (HCl) biasa digunakan sebagai katalis. Pemilihan asam kuat sebagai katalis disebabkan karena asam kuat lebih mudah melepas proton (H^+) secara sempurna di dalam air, sedangkan asam lemah cenderung lebih sukar sehingga terionisasi sebagian dalam pelepasan ion (H^+). Semakin banyak proton yang terionisasi di dalam air maka semakin kuat proton dalam pemutusan ikatan glikosida (Handoko, 2006). Selain itu HCl akan membentuk garam NaCl yang tidak

berbahaya (Nihlati, dkk., 2008). Penambahan NaHCO_3 digunakan untuk proses pemberhentian reaksi hidrolisis yang disebut sebagai proses penetralan. Hal tersebut dilakukan karena glikosida bersifat stabil pada kondisi netral (Fessenden dan Fessenden, 1986). Reaksi pemutusan ikatan glikosida dengan HCl ditunjukkan pada gambar 2.2.



Gambar 2.2 Dugaan reaksi hidrolisis ikatan O-glikosida (Mardiyanah, 2012)

Miftahurrahmah (2012) melakukan ekstraksi alga merah *Euchema spinosum* menggunakan pelarut metanol, kemudian dilakukan perlakuan lebih lanjut menggunakan hidrolisis menggunakan HCl 2N dan diekstraksi cair-cair menggunakan variasi pelarut berupa kloroform, etil asetat, butanol, petroleum eter, dan *n*-Heksana. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas antibakteri dengan ekstrak yang telah dihidrolisis lebih besar dari pada sebelum hidrolisis. Data yang diperoleh yaitu zona hambat hasil hidrolisis fraksi petroleum eter terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* 5,5 mm dan 4 mm sebelum terhidrolisis.

2.4 Partisi (Ekstraksi Cair-Cair)

Ekstraksi cair-cair dapat diartikan sebagai pemisahan komponen-komponen dalam ekstrak berdasarkan perbedaan tingkat kepolaran. Pada prinsipnya senyawa polar diekstraksi dengan pelarut polar, sedangkan pelarut non polar diekstraksi dengan senyawa non polar. Ekstrak kental yang telah didapatkan dari proses

ekstraksi metanol masih berupa ekstrak kasar dan isinya masih sangat kompleks, untuk itu perlu dilakukan fraksinasi cair-cair atau partisi. Pemisahan dilakukan berdasarkan tingkat kepolaran, dimulai dari non polar, semipolar hingga polar.

Dalam pelaksanaan partisi, untuk memisahkan dua pelarut yang konstanta dielektriknya berjauhan dianjurkan menggunakan corong pisah bentuk buah pear atau yang lebih bulat. Pelarut yang konstanta dielektriknya berdekatan, pada saat partisi dianjurkan menggunakan corong pisah yang bentuknya lebih memanjang. Hasil pemisahan partisi yang memiliki konstanta dielektriknya tinggi akan berada pada posisi atas, sedangkan yang memiliki konstanta dielektrik lebih kecil akan berada pada posisi bawah corong pisah (Saifuddin, 2014).

n-Heksana adalah hasil penyulingan minyak tanah yang telah bersih, terdiri atas suatu campuran rangkaian hidrokarbon, tidak berwarna, transparan, bersifat mudah terbakar, baunya khas, tidak dapat larut dengan air, dapat larut dengan alkohol, benzene, kloroform dan eter. Senyawa yang dapat larut dalam pelarut *n*-heksana yaitu senyawa yang bersifat non polar seperti terpenoid, triterpenoid sterol, dan fenil propanoid (Tiwari, dkk., 2011).

Etil asetat merupakan merupakan cairan jernih tidak berwarna pada suhu kamar dengan bau khas seperti buah. Etil asetat larut dalam 15 bagian air, dapat tercampur dengan eter, etanol, dan kloroform. Etil asetat ialah pelarut semi polar, mudah terbakar dan menguap, maka penyimpanannya dalam wadah yang tertutup rapat serta terhindar dari panas. Senyawa yang larut dalam pelarut ini adalah flavonoid, alkaloid, senyawa-senyawa fenolik seperti fenol-fenol, asam fenolat, fenil propanoid, antrakuinon dan xanton (Harborne 2006). Pemilihan etil asetat karena memiliki sifat semipolar yang dapat melarutkan senyawa semipolar pada

dinding sel seperti flavonoid. Selain itu, dapat mencari senyawa-senyawa yang memberikan aktivitas antibakteri, diantaranya flavonoid dan fenol (Indarto 2019).

Air adalah pelarut yang sangat polar digunakan untuk menyari senyawa organik polar sehingga cocok digunakan untuk pelarut polar dalam proses fraksinasi. Pemekatan yang dapat dilakukan dengan diuapkan dengan tangas air menggunakan penangas air. Pelarut air dipilih karena air dapat melarutkan garam alkaloid, minyak menguap, glikosida, tanin, gula, pati, protein, enzim, lemak, pektin, dan zat warna asam organik. Kekurangan menggunakan air adalah zat aktif yang tersaring dapat ikut dalam pelarut tersebut. Air juga merupakan tempat tumbuh bagi kuman, kapang dan khamir (Depkes, 2005).

Menurut Alfiyaturrohmah (2013) metabolit sekunder yang mempunyai aktivitas antibakteri ialah flavonoid dan steroid. Selain itu triterpenoid dan alkaloid juga mempunyai aktivitas antibakteri (Miftahurrahman, 2012). Sehingga pada proses partisi dipilih jenis pelarut yang memiliki kepolaran yang sama dengan senyawa target.

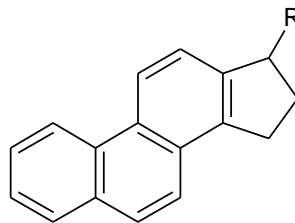
2.5 Identifikasi Senyawa Aktif

Berikut beberapa kandungan metabolit sekunder yang terdapat dalam daun beluntas yang berpotensi membawa pengaruh khasiat.

2.5.1 Steroid

Steroid merupakan golongan senyawa lipid turunan dari perhidrosiklopentanofenantrena yang terdiri dari 3 cincin sikloheksana dan 1 cincin siklopentana di ujung cincin sikloheksana. Steroid bersifat non polar karena

tersusun dari isoprene, namun steroid yang memiliki gugus –OH lebih bersifat polar yang disebut sebagai sterol (Kristanti, dkk., 2008). Steroid terdapat glikosida yang terdiri dari gula dan aglikon. Adanya gula yang terikat dan bersifat polar mengakibatkan glikosida mampu larut dalam pelarut polar. Namun sebaliknya, aglikon berupa steroid yang bersifat nonpolar menyebabkan steroid lebih larut pada pelarut nonpolar (Purwatresna, 2012). Adapun struktur steroid dapat dilihat dari Gambar 2.3.



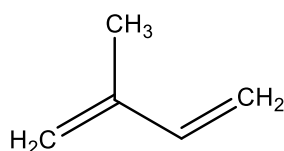
Gambar 2.3 Struktur steroid (Poedjiadi, 1994)

Steroid memiliki peranan penting bagi tubuh dalam mengendalikan metabolisme tubuh, menjaga keseimbangan garam, dan meningkatkan fungsi organ seksual (Bhawani dkk., 2011). Steroid dapat berinteraksi dengan membran fosfolipid sel yang bersifat permeabel terhadap senyawa-senyawa lipofilik sehingga menyebabkan integritas membran menurun serta morfologi membran sel berubah menyebabkan sel rapuh dan lisis. Sehingga menyebabkan kematian bakteri (Sapara, 2016).

2.5.2 Triterpenoid

Triterpenoid merupakan senyawa metabolit sekunder yang dibangun oleh dua atau lebih unit atom C_5 yang disebut unit isoprene dan diturunkan dari hidrokarbon C_{30} asiklik yaitu skualen. Senyawa ini berstruktur siklik berupa

alkohol, aldehid atau asam karboksilat. Ciri khas dari isoprene ialah memiliki struktur “ekor” dan “kepala” yang berikatan pada ujung cabang metil dengan ujung yang lain (Harborne, 1987). Struktur Isoprene dapat dilihat pada Gambar 2.4.



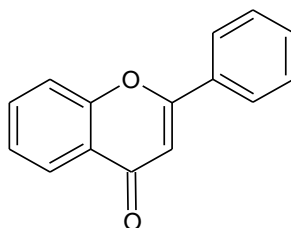
Gambar 2.4 Struktur isoprene (Sastrohamidjojo, 1996)

Mekanisme kerja senyawa antibakteri yang mengandung terpenoid biasanya dengan cara merusak struktur dinding sel, mengganggu kerja transport aktif dan kekuatan proton di dalam membran sitoplasma bakteri (Rahmawati, 2017). Uji positif golongan senyawa terpenoid dengan pereaksi Liebermann-Burchard membuktikan terbentuknya warna merah keunguan (Salni, 2011).

2.5.3 Flavonoid

Golongan flavonoid digambarkan dengan senyawa C₆-C₃-C₆ artinya terdiri dari kerangka dua gugus benzene (C₆) yang disambung oleh rantai alifatik tiga karbon. Senyawa kimia yang termasuk golongan flavonoid yaitu flavonol, flavon, flavonon, katekin, atosianidin dan kalkon (Robinson 1995). Senyawa flavonoid yang disintesis dari tanaman sebagai sistem pertahanan terhadap infeksi oleh mikroorganisme, sehingga senyawa ini efektif sebagai antibakteri terhadap beberapa jenis mikroba (Parubak, 2013). Flavonoid memiliki sejumlah gugus hidroksil yang larut dalam pelarut polar seperti metanol, etanol, butanol, aseton, dan dimetil sulfoksid (Sjahid, 2008).

Flavonoid sebagai antibakteri memiliki mekanisme dengan cara mengganggu fungsi membrane sitoplasma, sehingga dapat merusak dinding sel bakteri. Flavonoid juga berperan untuk menghambat sintesis energi, senyawa ini menghambat sistem respirasi untuk penyerapan aktif berbagai metabolit dan untuk biosintesis makromolekuler (Ngajow, dkk., 2013). Pada bidang farmakologi flavonoid dapat digunakan sebagai anti-radang, antibody, anti-tumor, anti-oksidan, meningkatkan immunoglobulin, mengurangi pembuluh kapiler. Biasanya dalam cincin heterosiklik dan bersifat aktif biologis (Hasanah, 2009). Adapun strukturnya dapat dilihat pada Gambar 2.5.



Gambar 2.5 Struktur flavonoid (Robinson, 1995)

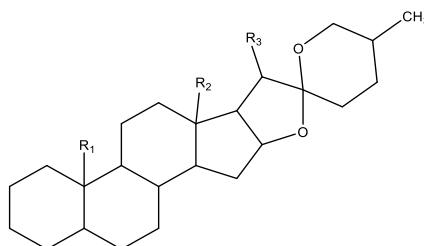
Uji fitokimia flavonoid menunjukkan hasil positif ditandai dengan terbentuknya warna merah sampai jingga yang menandakan adanya senyawa flavon, merah tua diberikan oleh flavonon dan flavonol, dan warna hijau sampai biru (Marliana, dkk., 2005). Penelitian Boonruang, dkk (2017) menghasilkan identifikasi senyawa aktif daun tanaman beluntas positif mengandung flavonoid.

2.5.4 Saponin

Saponin merupakan senyawa glikosida kompleks dengan berat molekul tinggi yang dihasilkan oleh tanaman, hewan laut, dan beberapa bakteri. Dalam kesehatan, saponin memiliki fungsi sebagai zat antioksidan, anti inflamasi,

antijamur, penyembuh luka, dan antibakteri (Novitasari dan Putri, 2016). Saponin terlarut dalam air dan etanol (Rikamah dan Elmitra, 2017). Struktur inti saponin ditampilkan pada Gambar 2.6.

Saponin sebagai antibakteri memiliki mekanisme menurunkan tegangan permukaan dinding sel bakteri dan merusak permeabilitas membran (Madduluri, dkk., 2013). Saponin berdifusi melalui membrane luar dan dinding sel yang rentan lalu mengikat membran sitoplasma sehingga mengganggu kestabilan membran sel. Hal ini menyebabkan sitoplasma bocor keluar dari sel dan menyebabkan kematian sel (Cavelieri, dkk., 2005).

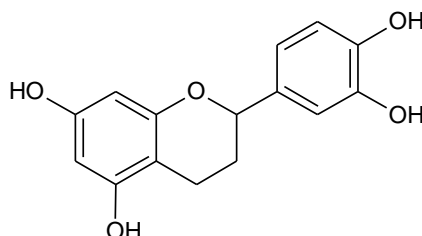


Gambar 2.6 Struktur inti saponin (Robinson, 1995)

2.5.5 Tanin

Tanin diklasifikasikan menjadi 2 kategori, yaitu tanin hidrolisis dan tanin kondensasi (Akiyama, dkk., 2001). Tanin memiliki struktur beragam, tergantung pada area ditemukannya. Tanin biasanya ditemukan pada daun, akar, biji, tunas, dan batang. Dalam kesehatan, tanin bermanfaat untuk antidiare, homeostatik, antihemoroidal, gastritis, iritasi, dan antibakteri (Ashok, 2012). Tanin merupakan senyawa makromolekul dari golongan polifenol yang bersifat polar, sehingga larut dalam pelarut polar (Romadanu, 2014). Tanin memiliki persenyawaan fenol yang memiliki gugus hidroksil di dalamnya maka mekanisme dalam menaktifkan bakteri dengan cara menggerutkan permeabilitas sel itu sendiri. Akibat terganggunya

permeabilitas, maka sel tidak dapat melakukan aktivitas hidup sehingga pertumbuhannya terhambat atau bahkan mati (Alamsjah, dkk., 2011). Berikut adalah struktur inti senyawa tanin Gambar 2.7.



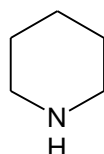
Gambar 2.7 Struktur inti senyawa tanin (Robinson, 1995)

Ekstrak yang mengandung tanin akan bereaksi positif memberikan warna biru kehitaman pada tanin terhidrolisis dan memberikan endapan kehijauan pada tanin terkondensasi, jika ditambahkan dengan besi (III) klorida. Tanin sebagai antibakteri mempunyai mekanisme mempresipitasi protein, menghambat enzim transkriptase dan DNA topoisomerase sehingga sel bakteri tidak dapat terbentuk, sedangkan bakteri berlindung pada dinding selnya (Nuria, 2009). Tanin membentuk senyawa kompleks dengan ion logam sehingga meningkatkan toksisitas tanin (Akiyama, dkk., 2001).

2.5.6 Alkaloid

Senyawa golongan alkaloid yang berasal dari tanaman, umumnya merupakan amina tersier yang terdiri dari nitrogen primer, sekunder, dan quaterner. Alkaloid minimal mengandung atom nitrogen yang bersifat basa dan sebagian besar memiliki cincin aromatis (Trisyanto, 2009). Pelarut non polar (*n*-heksana) dikenal efektif terhadap alkaloid, selain itu alkaloid juga dapat terlarut dalam senyawa semi polar (etil asetat) dan polar (Romadanu, dkk., 2014). Alkaloid biasanya mudah

menguap. Fungsi alkaloid bagi tumbuhan antara lain sebagai zat beracun untuk melawan serangga atau hewan pemakan tumbuhan. Sifat lain alkaloid yaitu sukar larut dalam air dan jika direaksikan dengan suatu asam akan membentuk garam alkaloid yang lebih mudah larut (Oktavia, dkk., 2013). Struktur inti alkaloid dapat dilihat pada Gambar 2.8.



Gambar 2.8 Struktur inti alkaloid (Robinson, 1995)

Hasil positif alkaloid pada uji mayer dengan terbentuknya endapan putih, pada uji Mayer mengalami perubahan warna menjadi coklat dan pada uji Drangedroff mengalami perubahan warna menjadi oranye (Ergina, 2014). Senyawa sebagai antibakteri memiliki mekanisme menghambat enzim topoisomerase bakteri dan menghambat replikasi DNA. Penghambatan replikasi DNA tidak dapat membelah dan menghambat pertumbuhan bakteri (Ernawati, 2015).

2.6 Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA)

KLT ialah metode pemisahan fisikokimia yang didasarkan pada perbedaan distribusi molekul-molekul komponen diantara dua fase yaitu fase gerak/eluen dan fase diam/absorben yang memiliki tingkat kepolaran yang berbeda (Hendayana, 2006). Kromatografi lapis tipis banyak digunakan karena proses analisisnya cukup sederhana sehingga lebih mudah dan cepat. KLT digunakan untuk memisahkan suatu senyawa dari campurannya sehingga dihasilkan senyawa yang lebih murni (Kristanti, dkk., 2008).

Prinsip KLT adalah memisahkan ekstrak berdasarkan perbedaan kepolaran antara ekstrak dengan eluen/fasa gerak. Kecepatan gerak senyawa bergantung pada eluen/fasa gerak yang digunakan (Wulandari, 2011). Fase diam dalam KLT yaitu lapisan tipis silica gel, aluminium oksida, atau selulosa. Fase geraknya adalah pelarut campuran yang ditempatkan dalam bejana pengembang. Pemilihan pelarut pengembang yang sesuai biasanya merupakan bagian paling sulit dari eksperimen menggunakan KLT, dan pelarut pengembang adalah faktor dengan pengaruh terbesar, pelarut yang disiapkan harus homogen tanpa tanda kekeruhan. Tiga kriteria biasanya dipertimbangkan untuk memilih sistem pelarut: kelarutan, afinitas, dan resolusi. Fase gerak yang diinginkan dapat memberikan kelarutan terbesar, menyeimbangkan afinitas sampel untuk pelarut dan fase diam untuk mencapai pemisahan. Resolusi ditingkatkan dengan mengoptimalkan afinitas antara sampel, dan pelarut (Cai, 2014). Campuran dua pelarut organik yang daya elusi campuran keduanya mudah diatur adalah sistem pelarut yang paling sederhana untuk mengoptimalkan pemisahan (Braithwaite dan Smith, 1999).

Tabel 2.1 Warna dan dugaan senyawa pada lampu UV-Vis (Ardiansyah, 2019)

| No. | Warna | Dugaan Senyawa | Literatur |
|-----|---------------------------|----------------|------------------------------|
| 1. | Hijau | Steroid | Heftman, E. (1976) |
| 2. | Hijau-kebiruan | Steroid | Babu, dkk., (2015) |
| 3. | Merah-muda-merah | Triterpenoid | Farnsworth (1996) |
| 4. | Jingga-kuning | Alkaloid | Svensen dan Verpoorte (1983) |
| 5. | Ungu | Tanin | Harborne (1987) |
| 6. | Biru muda, coklat, kuning | Flavonoid | Harborne (1987) |
| 7. | Ungu kehitaman | Saponin | Hajnos, dkk., (2008) |
| 8. | Jingga | Flavonoid | Markham (1988) |

Pada kromatografi lapis tipis, larutan cuplikan atau sampel ditotolkan pada plat dengan pipet mikro atau injektor pada jarak 1 cm dari batas plat. Setelah kering,

plat siap untuk dikembangkan dengan fasa gerak yang telah dijenuhkan sampai pada batas tertentu. Hal tersebut dilakukan untuk memperoleh hasil pemisahan yang terbaik. Untuk mengidentifikasi senyawa dalam plat KLT dapat dilakukan dengan beberapa cara yaitu pengamatan langsung untuk noda/bercak yang tampak, dan dengan lampu UV pada rentang panjang gelombang 366 nm (Sari, 2010). Pada tiap senyawa menunjukkan warna sitasi yang berbeda-beda hal tersebut dapat dilihat pada Tabel 2.1.

Analisis secara kuantitatif menggunakan KLT digunakan untuk mengidentifikasi suatu senyawa metabolit sekunder dengan parameter nilai *retardation factor* (R_f). Senyawa yang terpisah dapat diidentifikasi dengan nilai R_f pada persamaan 2.1.

$$R_f = \frac{\text{Jarak perjalanan suatu senyawa}}{\text{Jarak perjalanan suatu fasa gerak}} \dots\dots\dots (2.1)$$

Harga R_f ini bergantung pada beberapa parameter yaitu sistem pelarut, adsorben, jumlah bahan yang ditotolkan pada plat dan suhu (Rasyidi, 2016). Keuntungan menggunakan KLT antara lain waktu yang dibutuhkan relatif pendek (2-5 menit), ekstrak yang dipakai hanya sedikit (2-20 μg), dapat memonitor identitas dan kemurnian ekstrak, sedangkan kerugiannya adalah tidak efektif dalam skala industri. Walaupun lembaran KLT yang digunakan lebih lebar dan tebal, pemisahannya sering dibatasi hanya sampai beberapa milligram sampel saja. Metode ini kepekaannya cukup tinggi dengan jumlah cuplikan beberapa mikrogram (Mayo, 2000 dalam Simarmata, 2013).

2.7 Identifikasi Senyawa Aktif Menggunakan Spektroskopi UV-Vis

Spektroskopi UV-Vis merupakan salah satu teknik analisis spektroskopi yang memakai sumber radiasi elektron ultraviolet pada rentang 190-380 nm dan sinar tampak pada rentang 380-780 nm dengan memakai instrument spektrofotometer. Spektroskopi UV-Vis melibatkan energi elektronik yang cukup besar pada molekul yang dianalisis, sehingga spektroskopi UV-Vis digunakan untuk analisis kuantitatif (Putri, 2017). Spektrometer digunakan untuk mengamati dan mengukur sudut deviasi cahaya datang dengan panjang gelombang tertentu dan fotometer adalah alat pengukur intensitas cahaya yang ditransmisikan atau *diabsorpsi*. Spektroskopi tersusun atas sumber cahaya, monokromator, wadah sampel (kuvet), detektor, dan rekorder. Pada spektroskopi Uv-Vis menggunakan pembandingan antara blanko dan sampel yang akan dianalisa (Khopkar, 2003).

Prinsip spektroskopi adalah larutan sampel yang dikenai radiasi elektromagnetik, sehingga larutan tersebut menyerap energi/radiasi yang menyebabkan terjadinya interaksi antara radiasi elektromagnetik dengan materi (atom/molekul). Jumlah intensitas radiasi yang diserap oleh larutan sampel terukur dalam bentuk transmittan dan absorbansi dikonversi menjadi konsentrasi analat yang kemudian menjadi data kuantitatif (Yulianti, 2008). Analisis ini dapat menjelaskan informasi dari struktur berdasarkan panjang gelombang maksimum suatu senyawa (Sastrohamidjojo, 2007).

Spektrum khas steroid atau triterpenoid yaitu pada panjang gelombang 203,9–276 nm (Fasya, dkk., 2020). Alkaloid memiliki serapan khas pada rentang 270-300 nm (Pramita, dkk., 2013). Flavonoid memiliki dua serapan khas yaitu pada pita II 230-290 nm dan pita I 300-560 nm (Fikayuniar, dkk., 2020). Tanin memiliki

serapan pada panjang gelombang 280 nm (Owu & Jayanti, 2020). Dan serapan khas panjang gelombang saponin yaitu 209 nm (Suharto, dkk., 2012). Berdasarkan serapan warna yang bermacam-macam pada setiap panjang gelombang ditunjukkan pada Tabel 2.2.

Tabel 2.2 Warna dan warna komplementer (Putri, 2017)

| Panjang Gelombang (nm) | Warna (adsorpsi) | Warna Komplementer |
|------------------------|------------------|--------------------|
| 340 – 450 | Violet (ungu) | Hijau kekuningan |
| 450 – 480 | Biru | Kuning |
| 480 – 490 | Biru kehijauan | Jingga |
| 490 – 500 | Hijau kebiruan | Merah |
| 500 – 560 | Hijau | Ungu kemerahan |
| 560 – 580 | Hijau kekuningan | Ungu |
| 580 – 595 | Jingga | Biru kehijauan |
| 595 – 610 | Merah | Hijau kebiruan |
| 610 – 750 | Ungu kemerahan | Hijau |

2.8 Analisis Gugus Fungsi Senyawa Aktif Menggunakan Spektroskopi IR

IR merupakan salah satu instrument yang menggunakan prinsip spektroskopi. Spektroskopi infra merah digunakan untuk mendeteksi gugus fungsional, mengidentifikasi senyawa dan menganalisis campuran (Day dan Underwood, 1999). Senyawa organik yang berbeda akan mempunyai spektra yang berbeda (Hayati, 2007). Bilangan gelombang (Tabel 2.3) yang sering digunakan dalam analisis senyawa bahan alam yaitu pada daerah infra merah tengah rentang 4000-400 cm^{-1} . Keuntungan menggunakan IR antara lain diperoleh informasi struktur molekul secara tepat dan akurat dengan resolusi tinggi dan identifikasi sampel dapat dilakukan dalam berbagai fase, baik pada fase padat, cair maupun gas.

Spektroskopi IR merupakan spektroskopi inframerah yang dilengkapi dengan transformasi fourier untuk mendeteksi dan analisis hasil spektrumnya. Inti spektroskopi IR adalah interferometer Michelson yaitu alat untuk menganalisis

frekuensi dalam sinyal gabungan. Spektrum inframerah tersebut dihasilkan dari penentrasmisian cahaya yang melewati sampel, pengukuran intensitas cahaya dengan detektor dan dibandingkan dengan intensitas tanpa sampel sebagai fungsi panjang gelombang. Spektrum inframerah yang diperoleh kemudian diplot sebagai intensitas fungsi energi, panjang gelombang (μm) atau bilangan gelombang (cm^{-1}) (Anam, dkk., 2007).

Tabel 2.3 Panjang gelombang inframerah (Day dan Underwood, 1999)

| Gugus | | Bilangan Gelombang (cm^{-1}) | Panjang Gelombang (nm) |
|--------------------------|-------------|--|------------------------|
| OH | Alkohol | 3580 - 3650 | 2,74 – 2,79 |
| | Berikatan H | 3210 - 355 | 2,82 – 3,12 |
| | Asam | 2500 - 2700 | 3,70 – 4,00 |
| NH | Amina | 3300 - 3700 | 2,70 – 3,03 |
| CH | Alkana | 2850 - 2960 | 3,37 – 3,50 |
| | Alkena | 3010 - 3095 | 3,23 – 3,32 |
| | Aromatik | ~3300 | 3,03 |
| $\text{C}\equiv\text{C}$ | Alkuna | 2140 - 2260 | 4,42 – 4,76 |
| $\text{C}=\text{C}$ | Alkena | 1620 - 1680 | 5,95 – 5,81 |
| | Aromatik | ~1600 | ~6,25 |
| | Aldehida | 1720 - 1740 | 5,75 – 5,81 |
| $\text{C}=\text{O}$ | Keton | 1675 - 1725 | 5,79 – 5,97 |
| | Asam | 1700 - 1725 | 5,79 – 87,0 |
| | Nitril | 2000 - 2300 | 4,35 – 5,00 |

2.9 Uji Aktivitas Antibakteri

Antibakteri merupakan zat yang dapat menghambat atau membunuh bakteri penyebab infeksi. Infeksi yang disebabkan oleh bakteri atau mikroorganisme yang bersifat patogen (Kulla, 2016). Antibakteri termasuk kedalam antimikroba yang digunakan untuk menghambat pertumbuhan bakteri dan digolongkan berdasarkan cara kerja, spektrum kerja, dan daya bunuh terhadap bakteri (Annisa, 2017).

Suatu zat aktif dikatakan memiliki aktivitas sebagai antibakteri apabila dalam konsentrasi yang rendah mampu memberi daya hambat terhadap bakteri. Zat

antibakteri dapat bersifat bakterisidal (membunuh bakteri), bakteriostatik (mengambat pertumbuhan bakteri), dan germisida (menghambat pertumbuhan spora bakteri). Ruang lingkup antibakteri yang dapat dipengaruhi oleh zat antibakteri disebut dengan spektrum antibakteri (Agustrina, 2011). Kepekaan bakteri terhadap senyawa yang berfungsi sebagai antibakteri berbeda-beda. Bakteri gram positif biasanya lebih peka dibandingkan dengan bakteri gram negatif (Brock dan Madigan, 1991).

Berdasarkan spektrum aksi antibakteri, zat antibakteri dibagi menjadi 3 yaitu: a) spektrum luas apabila zat tersebut aktif melawan prokariot. b) spektrum sempit, zat antibakteri efektif melawan sebagian bakteri gram positif atau gram negatif. c) spektrum terbatas, zat antibakteri yang efektif melawan suatu spesies bakteri tertentu (Agustrina, 2011).

Mekanisme kerja antibakteri berdasarkan mekanisme antibakterinya dapat dikategorikan menjadi empat, yaitu penghambatan sintesis dinding sel, penghambatan sintesis protein, mempengaruhi membran sel, dan mempengaruhi biosintesis asam nukleat (Volk dan Wheeler 1993). Metode difusi yang sering digunakan untuk uji aktivitas antibakteri adalah metode difusi cakram. Pengukuran zona hambat bakteri dengan mengamati diameter zona hambat di sekitar cakram yang dipergunakan (Jawetz, dkk., 2005).

Beberapa faktor yang dapat mempengaruhi ukuran zona hambat dan harus dikontrol adalah (Pratama, 2005):

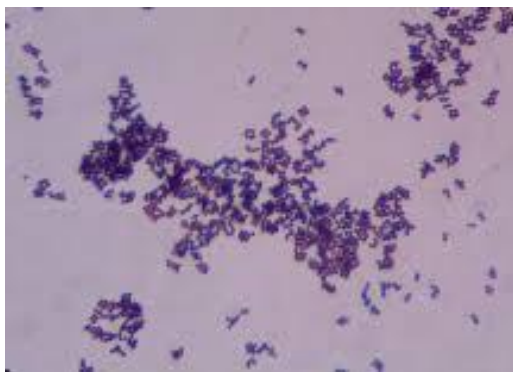
- a. Konsentrasi bakteri pada permukaan media. Semakin tinggi konsentrasi bakteri maka zona hambat yang dihasilkan akan semakin besar.

- b. Kedalam medium pada cawan petri. Semakin tebal medium dalam cawan petri maka zona hambat akan semakin kecil.
- c. Nilai pH dari medium. Beberapa antibiotik bekerja dengan baik pada kondisi asam dan beberapa kondisi basa.

Perkembangan obat antibakteri baru merupakan salah satu pendekatan untuk menangani resistensi antibiotik pada infeksi bakteri. Pada faktanya hanya terdapat dua kelas dari antibiotik yang telah dikenalkan pada dunia klinis sejak dua dekade. Keduanya tidak atif secara signifikan lagi terhadap bakteri gram negatif. Selanjutnya bakteri berkembang menjadi resistensi terhadap beberapa terapi pengobatan. Mekanisme bakteriostatik dan resistensi secara klinis dapat muncul dalam beberapa bulan hingga bertahun-tahun setelah pengenalan antibakteri baru ke dunia klinis. Oleh karena itu perlu dibuat perkembangan obat antibakteri baru lagi untuk menangani kasus resistensi antibiotik (Olagoke dkk, 2017).

2.9.1 Bakteri *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus merupakan bakteri gram positif ditampilkan pada Gambar 2.3 terbentuk bulat, umumnya tumbuh berpasangan dan berkelompok seperti anggur, tidak menghasilkan spora dan tidak motil (Habib, dkk., 2015). Bakteri ini tahan terhadap pengeringan dan dapat mentoleransi garam dengan konsentrasi tinggi (NaCl 10%) bila ditanam pada media buatan. Pada manusia bakteri ini merupakan flora normal, namun tetap menjadi patogen yang potensial (Madigan, dkk., 2012).



Gambar 2.9 Bakteri *Staphylococcus aureus* (Hayati, dkk., 2019)

Staphylococcus aureus berasal dari kata *Staphyle* yang berarti kelompok anggur dan kokus yang berarti benih bulat. *Aureus* berasal dari kata *aurum* yang artinya emas. Adapun klasifikasi taksonomi bakteri *Staphylococcus aureus* menurut Capuccino dan Natalie (2007) adalah sebagai berikut:

| | |
|-----------|--------------------------------|
| Kingdom | : Monera |
| Division | : Prothophyta |
| Sub Kelas | : Schizomycetea |
| Kelas | : Schizomycetes |
| Ordo | : Eubacteriales |
| Familia | : Micrococcaceae |
| Genus | : <i>Stapilococcus</i> |
| Spesies | : <i>Staphylococcus aureus</i> |

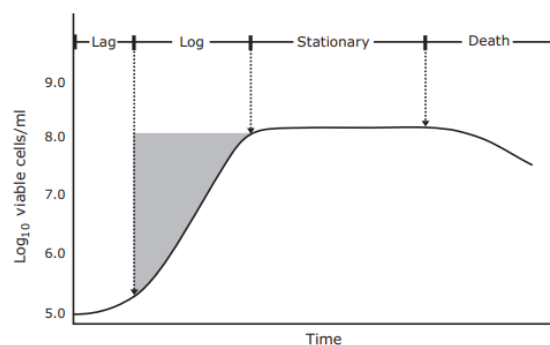
Staphylococcus aureus tumbuh dengan cepat pada berbagai tipe media dan dengan aktif melakukan metabolisme, melakukan fermentasi karbohidrat dan menghasilkan bermacam-macam pigmen dari warna putih hingga kuning gelap (Jawetz, dkk., 2008). Bakteri ini bersifat anaerob fakultatif, tumbuhan lebih cepat dan lebih banyak dalam keadaan aerobik (Pelczar dan Chan 1998).

Bakteri *Staphylococcus aureus* merupakan patogen yang paling berbahaya diantara genus *Staphylococcus* (Dwijoseputro,1987). Bakteri ini mudah tumbuh pada kulit yang mengalami radang, mmengalami luka yang mengarah pada infeksi

dan proses bernanah lainnya. Pada saluran pernafasan dapat menyebabkan infeksi intra abdomen yang dapat timbul karena komplikasi pasca bedah. Infeksi uranius dan infeksi traktus genetali pada wanita (Salle, 1961).

2.9.2 Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus*

Pertumbuhan sel adalah bertambah besarnya sel-sel baru hingga masing-masing sel tersebut menjadi sel-sel induk. Pertumbuhan sel dimulai setelah terjadi pembelahan sel. Faktor yang mempengaruhi pertumbuhan sel dalam penyerapan zat makanan antara lain media, kelembapan, pH, dan suhu.



Gambar 2.10 Grafik pertumbuhan bakteri (Kumar dan Mina, 2017)

Suhu optimum untuk pertumbuhan bakteri ini adalah 35-40 °C (Pelczar dan Chan, 1998). pH optimum untuk pertumbuhan bakteri ini pada pH 4,0-9,8 dengan pH optimum sekitar 7,0-7,5 (Supardi dan Sukanto, 1999). Pada Gambar 2.4 menunjukkan pertumbuhan bakteri yang dibagi menjadi empat fase yaitu (Kumar dan Mina, 2017):

a. Fase adaptasi (*lag*)

Pada fase ini sel-sel bakteri belum mengalami pertumbuhan dan masih beradaptasi dengan lingkungan serta media yang ada.

b. Fase eksponensial (*log*)

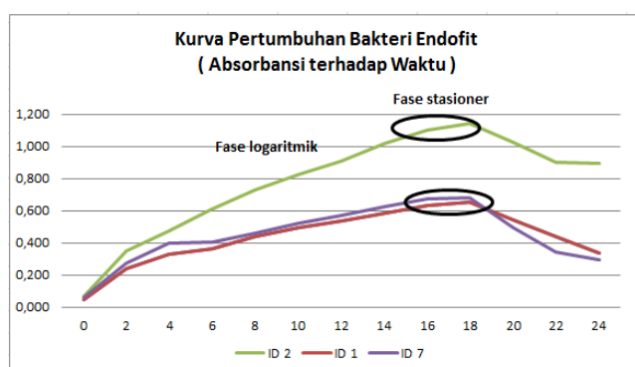
Pada fase ini sel-sel mulai terjadi pertumbuhan dan pembelahan bakteri berlangsung cepat, sehingga kurva meningkat dengan tajam. Hal ini disebabkan karena sel bakteri mulai menyerap zat-zat makanan yang tersedia pada media.

c. Fase stasioner

Pada fase ini pertumbuhan bakteri terhenti, laju pertumbuhan bakteri sama dengan laju kematian. Sehingga jumlah keseluruhan bakteri akan tetap. Keseimbangan yang terjadi akibat adanya pengurangan derajat pembelahan sel. Hal ini disebabkan oleh kadar nutrisi yang berkurang dan akumulasi produk buangan yang toksik sehingga mengganggu pembelahan sel.

d. Fase kematian

Pada fase ini, merupakan akhir dari suatu kurva, dimana jumlah sel yang mati lebih besar dari pada jumlah sel yang membelah diri, hal ini disebabkan habisnya zat makanan dan menumpuknya zat beracun mengakibatkan matinya sel-sel mikroba.



Gambar 2.11 Kurva pertumbuhan *Staphylococcus aureus* (Muhsinin, dkk., 2019)

Hasil penelitian (Muhsinin, dkk., 2019) didapatkan hasil kurva pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada Gambar 2.5. Diketahui bakteri ini mengalami fase *lag* terjadi pada jam ke-0 sampai jam ke-2. Kemudian pertumbuhan bakteri meningkat dan memasuki fase *log* pada jam ke-2 hingga jam ke 16. Selanjutnya bakteri mengalami fase stasioner terjadi pada jam ke-16 sampai jam ke-18. Dimana pada fase stasioner pertumbuhan bakteri cenderung tetap dan tidak mengalami perubahan secara signifikan.

2.10 Pemanfaatan Daun Beluntas (*Pluchea Indica* L.) dalam Perspektif Islam.

Daun beluntas merupakan tanaman yang banyak ditemukan di lingkungan sekitar, tanaman tersebut tumbuh secara liar pada daerah yang bertanah kering dan keras. Tanaman ini biasanya disebut sebagai tanaman pagar. Allah Swt. berfirman dalam al-Qur'an surat Asy Syu'ara ayat 7:

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَيْفَ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ

Artinya: “Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, betapa banyak Kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam pasangan (tumbuh-tumbuhan) yang baik?”

Ayat tersebut menjelaskan kekuasaan dan anugerah-Nya yang tak terhingga dengan menciptakan berbagai macam tumbuh-tumbuhan baik dan membawa banyak sekali manfaat bagi manusia. Banyak tumbuhan terbentang di luasnya tanah yang ada di bumi, dengan demikian ayat ini menunjukkan bahwa tumbuh-tumbuhan juga memiliki pasangan (benang sari dan putik) guna perkembangan dan pertumbuhan (Shihab, 2002). Selain itu tumbuhan juga bermanfaat bagi manusia

sebagai obat penyembuh penyakit. Daun beluntas umumnya dimanfaatkan untuk menghilangkan bau badan dan mulut, nyeri pada tulang dan gigi, menurunkan demam, mengatasi kurang nafsu makan dan haid yang tidak teratur (Fitriansyah, 2018).

Kandungan senyawa dalam daun beluntas memiliki beberapa aktivitas biologis yaitu sebagai antimalaria, anti inflamasi, antipiretik, antibakteri, antioksidan dan berbagai aktivitas farmakologi. Metabolit sekunder dalam bidang pengobatan memiliki aktivitas yang berbeda-beda. Salah satunya ialah golongan flavonoid yang terdiri atas gugus fenolik. Kandungan metabolit sekunder dapat ditemukan pada bagian tumbuhan yang dapat dimanfaatkan sebagai obat adalah bagian daun, batang, akar, rimpang, buah, dan bijinya (Savitri, 2008). Firman Allah Swt. dalam surat Al-Hijr ayat 19 yang berbunyi:

وَالْأَرْضَ مَدَدْنَاهَا وَأَلْقَيْنَا فِيهَا رُسُومًا وَأَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ شَيْءٍ مَّوْزُونٍ

Artinya: *“Dan Kami telah menghamparkan bumi dan menjadikan padanya gunung-gunung dan Kami tumbuhkan padanya segala sesuatu menurut ukuran.”*

Ayat tersebut menerangkan bahwa semua yang ada di bumi serta berbagai macam tumbuhan yang berada di sekitar gunung memiliki berbagai manfaat yang berbeda, yang telah ditakdirkan dan diketahui termasuk yang dibutuhkan oleh manusia. Sehingga manusia dapat memanfaatkan tumbuhan secara seimbang. Setiap tumbuhan diberi potensi yang sesuai dengan kadar yang cukup untuk melaksanakan fungsinya dan semuanya saling terkait, saling menunjang dalam suatu keseimbangan (Shihab, 2002). Potensi dalam daun beluntas salah satunya sebagai antibakteri yang bermanfaat untuk menghambat pertumbuhan bakteri

Staphylococcus aureus yang biasanya terdapat pada mulut, selaput lendir, dan luka (Jawetz, dkk., 1995). Khasiat daun beluntas diperoleh dari kandungan metabolit kimia salah satunya ialah flavonoid yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* yang menyebabkan gingivitis dan periodontitis (Hariana, 2006).

Manusia dan tumbuh-tumbuhan sangat erat kaitannya dalam kehidupan. Banyak sekali manfaat yang diperoleh manusia dari tumbuh-tumbuhan namun masih banyak pula tumbuh-tumbuhan yang ada di sekitar kita belum diketahui manfaatnya. Keberadaan tumbuh-tumbuhan merupakan berkah dan nikmat Allah yang diberikan kepada seluruh makhluk-Nya. Allah menciptakan tumbuhan tidaklah sia-sia. Dalam satu tumbuhan memiliki beraneka ragam manfaat, bahkan jauh lebih banyak dari pada yang telah diketahui manusia. Salah satunya digunakan sebagai obat untuk menyembuhkan penyakit. Setiap penyakit makhluk Allah pasti ada obatnya karena Allah Swt., telah menyiapkan segala macam obat untuk menyembuhkan penyakit. Sesuai sabda Rasulullah:

مَا أُنزِلَ اللَّهُ رَائِي إِلَّا أَنْزَلَ لَهُ شِفَاءً

Artinya: "*Sesungguhnya Allah tidaklah menurunkan penyakit kecuali Dia turunkan pula obat bersamanya*". (HR. Ahmad).

Hadist tersebut menjelaskan bahwa sesungguhnya setiap penyakit yang diturunkan oleh Allah selalu ada obatnya. Namun, manusia tetap harus berikhtiar untuk menemukan obat yang dapat menyembuhkan penyakitnya. Seperti halnya melakukan penelitian terhadap tumbuh-tumbuhan yang diduga mengandung senyawa yang dapat berperan sebagai obat dari suatu penyakit, khususnya

antibakteri. Dalam penelitian ini akan diuji aktivitas antibakteri pada tumbuhan daun beluntas terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Tumbuhan ini diduga mempunyai aktivitas antibakteri karena mengandung senyawa-senyawa metabolit sekunder yang terdapat di dalamnya. Hal ini dibuktikan oleh penelitian Hidayat (2017) bahwa daun beluntas mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus*, dan *Staphylococcus epidermis*.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Agustus sampai November 2021 di Laboratorium Kimia Organik dan Laboratorium Instrumen Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah seperangkat alat gelas, neraca analitik, bola hisap, mortar, pisau, kertas saring, corong *Buchner vacum*, cawan porselen, gelas arloji, neraca analitik, gunting, lemari asam, inkubator, *rotary evaporator vacum*, *shaker*, *vortex*, corong pisah, desikator, *oven*, *hot plate*, *aluminium foil*, *plastic wrap*, kertas saring Wathman, *stirer*, botol larutan, *microtube*, *microplate*, *sentrifuge*, *chamber* KLT bejana pengembang, plat silika gel F₂₅₄, spektroskopi IR, dan spektroskopi UV-Vis.

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun beluntas (*Pluchea Indica* L.), metanol, gas N₂, aquades, *n*-Heksana, etil asetat, kloroform, DMSO, HCl 2N, H₂SO₄ pekat, natrium bikarbonat (NaHCO₃), larutan reagen (Dragendroff, Mayer, Lieberman Burchard), asam asetat anhidrat, FeCl₃ 1%, NaOH

1 N, plat KLT Silika Gel₂₅₄, *Staphylococcus aureus*, media *Nutrient Agar* (NA), media *Nutrient Broth* (NB), kertas cakram, dan kapas.

3.3 Rancangan Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah penelitian secara kualitatif dan kuantitatif melalui dua tahap pengujian eksperimental di laboratorium. Proses penelitian dilakukan sebagai berikut daun beluntas (*Pluchea indica* L.) dikeringkan dan diayak hingga halus, selanjutnya dimaserasi dengan pelarut metanol dan dipisahkan dengan *rotary evaporator* dan dialiri gas N₂. Ekstrak pekat kemudian dihidrolisis dengan asam klorida (HCl) 2 N lalu dilakukan partisi bertingkat dengan *n*-heksana, etil asetat dan air. Hasil ekstrak dan fraksi diuji fitokimia dan KLTA. Identifikasi senyawa kimia menggunakan spektroskopi UV-Vis dan spektroskopi IR. Selanjutnya, di uji aktivitas antibakteri dengan menggunakan metode difusi agar dan dilakukan secara duplo dengan variasi pelarut terdapat pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Aktivitas Antibakteri Ekstrak dan Fraksi dengan Variasi Konsentrasi

| Pelarut | Konsentrasi | Aktivitas Antibakteri (%) | | |
|-----------------------------|-------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | | U ₁ | U ₂ | U ₃ |
| Ekstrak Metanol | A | A ₁ U ₁ | A ₁ U ₂ | A ₁ U ₃ |
| | B | B ₁ U ₁ | B ₁ U ₂ | B ₁ U ₃ |
| | C | C ₁ U ₁ | C ₁ U ₂ | C ₁ U ₃ |
| Fraksi <i>n</i> -Heksana | A | A ₂ U ₁ | A ₂ U ₂ | A ₂ U ₃ |
| | B | B ₂ U ₁ | B ₂ U ₂ | B ₂ U ₃ |
| | C | C ₂ U ₁ | C ₂ U ₂ | C ₂ U ₃ |
| Fraksi Etil Asetat | A | A ₃ U ₁ | A ₃ U ₂ | A ₃ U ₃ |
| | B | B ₃ U ₁ | B ₃ U ₂ | B ₃ U ₃ |
| | C | C ₃ U ₁ | C ₃ U ₂ | C ₃ U ₃ |
| Fraksi Air | A | A ₄ U ₁ | A ₄ U ₂ | A ₄ U ₃ |
| | B | B ₄ U ₁ | B ₄ U ₂ | B ₄ U ₃ |
| | C | C ₄ U ₁ | C ₄ U ₂ | C ₄ U ₃ |
| Kontrol (+) | A | A ₅ U ₁ | A ₅ U ₂ | A ₅ U ₃ |
| Kontrol (-) | A | A ₆ U ₁ | A ₆ U ₂ | A ₆ U ₃ |

3.4 Tahapan Penelitian

Tahapan-tahapan yang dilakukan dalam penelitian ini yaitu:

- a. Preparasi sampel,
- b. Penentuan kadar air,
- c. Ekstraksi sampel,
- d. Hidrolisis dan partisi (Ekstraksi Cair-Cair),
- e. Uji fitokimia senyawa metabolit sekunder,
- f. Uji senyawa aktif dengan KLTA,
- g. Identifikasi senyawa aktif menggunakan spektroskopi Uv-Vis,
- h. Identifikasi senyawa aktif dengan spektroskopi FTIR,
- i. Uji Aktivitas Antibakteri,
- j. Analisis data.

3.5 Cara Kerja

3.5.1 Preparasi Sampel

Daun beluntas (*Pluchea Indica L.*) diambil sebanyak 4 Kg dan dicuci dengan air hingga kotoran yang menempel hilang, kemudian dipetik daunnya lalu dikeringanginkan selama 3 hari pada suhu kamar 25-27 °C dan sampel yang sudah kering dihaluskan dengan ukuran 40 mesh untuk mendapatkan ekstrak tepung (Widyawati, dkk., 2012).

3.5.2 Penentuan Kadar Air

Pada penentuan kadar air, disiapkan cawan porselen terlebih dahulu, lalu dipanaskan dalam *oven* pada suhu 105 °C sekitar 15 menit untuk menghilangkan kadar airnya. Cawan disimpan dalam desikator sekitar 10 menit, lalu ditimbang dan

dilakukan perlakuan yang sama sampai diperoleh berat cawan yang konstan. Setelah itu, sebanyak 1 gram sampel dimasukkan dalam cawan porselen, kemudian dimasukkan dalam *oven* dan dikeringkan pada suhu 105 °C selama ±15 menit, kemudian sampel disimpan dalam desikator sekitar ±10 menit dan ditimbang. Sampel tersebut dipanaskan kembali dalam *oven* ±15 menit, didinginkan dalam desikator dan ditimbang kembali. Perlakuan ini diulangi sampai berat konstan. Kadar air dalam daun beluntas dihitung menggunakan persamaan 3.1 (AOAC, 1984).

$$\text{Kadar Air} = \frac{(b-c)}{(b-a)} \times 100\% \dots\dots\dots (3.1)$$

Dengan nilai *a* adalah bobot cawan kosong, *b* adalah bobot sampel ditambah cawan sebelum dikeringkan, dan *c* adalah bobot cawan ditambah sampel setelah dikeringkan.

3.5.3 Ekstraksi Sampel

Ekstraksi komponen senyawa aktif dilakukan dengan cara ekstraksi maserasi atau perendaman. Serbuk daun beluntas yang telah dikeringkan ditimbang sebanyak 150 gram, dimana pada tahapan ini sampel di bagi menjadi tiga. Proses maserasi yang pertama, sampel sebanyak 50 gram dimasukkan ke dalam beaker glass 500 mL, kemudian ditutup dengan *aluminium foil*, diekstraksi secara maserasi menggunakan pelarut metanol sebanyak 250 mL (1:5 *b/v*) selama 3 x 24 jam pada suhu kamar kemudian dilakukan pengocokan menggunakan *shaker* dengan kecepatan 150 *rotation per minutes* (rpm) selama 3 jam. Setelah itu, dilakukan penyaringan menggunakan corong *Buchner*. Residu yang diperoleh

dimaserasi kembali menggunakan pelarut yang sama sebanyak 3 kali pengulangan dengan perlakuan yang sama sampai filtrat yang didapatkan bening. Setelah itu, dilakukan penyaringan. Filtrat yang diperoleh digabung menjadi satu. Lalu dipekatkan menggunakan *rotary evaporator vacuum* setelah itu dialiri gas N₂. Ekstrak pekat ditimbang lalu dihitung rendemennya dengan persamaan 3.2 (Khopkar, 2003).

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat sampel}} \times 100\% \dots\dots\dots (3.2)$$

Ekstrak yang diperoleh disimpan pada suhu 4 °C dan gelap sampai analisis selanjutnya.

3.5.4 Hidrolisis dan Ekstraksi Cair-Cair

Ekstrak pekat metanol sebanyak 12 gram, dihidrolisis dengan menambahkan 24 mL asam klorida (HCl) 2 N dengan perbandingan (1:2). Hidrolisis dilakukan selama 1 jam menggunakan *magnetic stirrer hot plate* pada suhu ruang (Tensiska, dkk., 2007). Masing-masing hidrolisat yang diperoleh ditambahkan dengan natrium bikarbonat (NaHCO₃) sampai pHnya netral. Proses partisi dilakukan menggunakan variasi pelarut dengan *n*-heksana, etil asetat, dan air. Ekstrak hasil hidrolisis dimasukkan dalam corong pisah dan ditambahkan pelarut *n*-heksana sebanyak 30 mL. Selanjutnya dilakukan pengocokan selama 15 menit, lalu didiamkan beberapa saat hingga terbentuk dua lapisan yaitu lapisan organik dan lapisan air. Masing-masing lapisan yang terbentuk kemudian dipisahkan. Lapisan organik fraksi *n*-heksana ditampung dalam *beaker glass* dan lapisan air yang diperoleh dipartisi kembali dengan pelarut etil asetat. Perlakuan ini

diulang hingga 3 kali pengulangan. Lapisan organik yang diperoleh dipekatkan dengan *rotary evaporator* dengan dialiri gas N₂ dan lapisan air dipekatkan dengan *oven*. Masing-masing fraksi kering ditimbang dan dihitung rendemennya.

3.5.5 Uji Fitokimia Senyawa Metabolit Sekunder

Uji fitokimia merupakan metode analisis kualitatif yang berfungsi untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam suatu sampel.

3.5.5.1 Uji Steroid/ Triterpenoid

Ekstrak daun beluntas konsentrasi sebanyak 1 mL dimasukkan dalam tabung reaksi, dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform lalu ditambah dengan 0,5 mL asam asetat anhidrat. Selanjutnya ditambah dengan 1-2 mL H₂SO₄ pekat (pereaksi Lieberman Burchard) melalui dinding tabung. Jika hasil yang diperoleh berupa cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan dua pelarut menunjukkan adanya triterpenoid, sedangkan jika terbentuk warna hijau kebiruan menunjukkan adanya steroid (Hayati, 2010).

3.5.5.2 Uji Flavonoid

Ekstrak daun beluntas pekat dimasukkan 0,5 gram ke dalam tabung reaksi kemudian dilarutkan dalam 1-2 mL metanol panas 50%. Setelah itu ditambahkan logam Mg dan 4-5 tetes HCl pekat. Warna merah, kuning, atau jingga pada larutan menunjukkan adanya flavonoid (Hayati, 2010).

3.5.5.3 Uji Saponin

Sebanyak 0,5 gram ekstrak dimasukkan kedalam tabung reaksi, ditambahkan 10 mL air panas, didinginkan dan kemudian dikocok vertikal selama 10 detik. Adanya pembentukan busa setinggi 1-10 cm yang stabil selama tidak kurang dari 10 menit menunjukkan positif golongan saponin. Pada penambahan 1 tetes HCl 2N, busa tidak hilang (Putri, Warditiani & Larasanti, 2013).

3.5.5.4 Uji Tanin

Sebanyak 1,5 gram ekstrak dilarutkan dalam 5 mL aquades kemudian ditetaskan larutan besi (III) klorida 10%. Jika terjadi perubahan warna menjadi hitam kehijauan menunjukkan adanya tanin dan polifenol (Simamere, 2014).

3.5.5.5 Uji Alkaloid

Ekstrak daun beluntas sebanyak 3 mL dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambah 1 mL HCl 2% dan larutan dibagi dalam dua tabung. Tabung I ditambah 2-3 tetes reagen Dragendroff, tabung II ditambah 2-3 tetes reagen Mayer. Jika tabung I terbentuk endapan jingga dan tabung II terbentuk endapan kekuning-kuningan menunjukkan adanya alkaloid (Hayati, 2010).

3.5.6 Uji Senyawa Aktif dengan Kromatografi Lapis Tipis Analitik

Ekstrak sampel yang memiliki zona hambatan paling luas kemudian dipisahkan secara kimia dengan KLT. Identifikasi dengan KLT dilakukan dengan menggunakan plat silika gel F₂₅₄ sebagai fase diam yang sudah diaktifkan dengan pemanasan dalam *oven* pada suhu 105 °C selama 30 menit. Plat silika gel dibuat

dengan ukuran lebar 5 x 10 cm pada ujung atas dan bawah diberi batas 1 cm. Ekstrak sampel ditotolkan sebanyak 5-10 totolan pada jarak ± 1 cm dari batas tepi bawah plat dengan pipa kapiler kemudian dikeringkan dielusi dengan menggunakan eluen. Setiap campuran fase gerak dimasukkan dalam *great chamber* lalu ditutup rapat dan dilakukan penjenuhan selama 20-30 menit. Eluen yang sudah jenuh dicek dengan membasahi kertas saring pada uap eluen. Setelah gerakan fase gerak sampai pada garis batas, elusi dihentikan. Selanjutnya diamati di bawah sinar UV 366 nm untuk menampakkan bercak noda. Kemudian diamati pada masing-masing hasil nodanya. Kemudian dihitung nilai R_f nodanya dengan cara diukur menggunakan penggaris sejauh noda yang tampak (Lestari, dkk., 2015).

3.5.7 Identifikasi Senyawa Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

Ekstrak dan fraksi daun beluntas dilarutkan sesuai dengan pelarutnya, kemudian diambil sebanyak 2 mL dimasukkan dalam kuvet dan diamati spektrumnya pada panjang gelombang 200-800 nm, sehingga terbentuk spektra. Selanjutnya ditandai panjang gelombang dan absorbansi puncak yang terbentuk (Maharani, dkk., 2016).

3.5.8 Identifikasi Gugus Fungsi Menggunakan Spektroskopi IR

Karakterisasi pada penelitian ini menggunakan spektroskopi IR. Ekstrak dan fraksi yang diperoleh digerus dengan garam KBr (2:98) lalu dibuat pellet menggunakan diameter 7 mm. Pelet kemudian diletakkan pada sampel *holder* dan diukur serapannya menggunakan spektroskopi IR pada daerah 4000-400 cm^{-1} . Sampel yang dianalisis harus dipastikan dalam kondisi kering serta bebas dari kotoran disekitar wadah penampung (Sigeo, dkk., 2002).

3.5.9 Uji Antibakteri

3.5.9.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Sterilisasi alat dilakukan dengan cara menutup alat-alat yang akan disterilkan dengan aluminium foil atau kapas, lalu dimasukkan dalam autoklaf kemudian diatur suhu pada 121 °C dengan tekanan 15 *per square inci* (psi) selama 15 menit (Muhibah, 2013). Alat-alat yang tidak tahan terhadap panas tinggi disterilkan dengan etanol 70% (Volk dan Wheeler, 1993).

3.5.9.2 Pembuatan Media *Nutrient Agar* (NA)

Media padat (*Nutrient Agar*) dibuat dengan cara diambil sebanyak 2 gram *Nutrient Agar* (NA) dilarutkan dalam 100 ml aquades dalam Erlenmeyer kemudian ditutup dengan *aluminium foil*. Suspensi dipanaskan hingga mendidih. Dimasukkan suspensi ke dalam tabung reaksi. Bagian ujung alat ditutup rapat menggunakan kapas dan dirapatkan kembali menggunakan *plastic wrap*. Selanjutnya, media disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121 °C dengan tekanan 15 *per square inci* (psi). Kemudian media untuk peremanjaan diletakkan dalam keadaan miring dan didiamkan pada suhu ruang hingga memadat (Muhibah, 2013).

3.5.9.3 Pembuatan Media *Nutrien Borth* (NB)

Media cair (*Nutrient Broth*) diambil sebanyak 0,8 gram *Nutrient Broth* (NB) ke dalam 100 ml aquades dalam Erlenmeyer. Kemudian ditutup dengan *aluminium foil*. Dipanaskan sampai mendidih. Selanjutnya, suspensi ditutup dengan kapas dan dirapatkan kembali menggunakan *plastic wrap*. Kemudian, media disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121 °C dengan tekanan 15 *per square inci* (psi) (Muhibah, 2013).

3.5.9.4 Peremajaan Bakteri *Staphylococcus aureus*

Biakan murni *Staphylococcus aureus* diambil 1 ose, kemudian digorekan pada media padat (*Nutrient Agar*) miring secara aseptis yaitu dengan mendekatkan mulut tabung pada nyala api saat menggorekan jarum ose. Kemudian tabung reaksi ditutup kembali dengan kapas dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C dalam inkubator. Kemudian diletakkan dalam lemari pendingin (Muhibah, 2013).

3.5.9.5 Pembuatan Inokulum Bakteri *Staphylococcus aureus*

Satu ose bakteri hasil peremajaan biakan murni dibiakkan dalam 10 ml media cair (*Nutrient Broth*) steril dan dihomogenkan. Kemudian diinkubasi selama 18 jam pada suhu 37 °C. Larutan ini berfungsi sebagai biakan aktif (Muhibah, 2013).

3.5.9.6 Uji Aktivitas Antibakteri

Media *Nutrien Agar* (NA) dipanaskan hingga mencair, didinginkan sampai suhu 40 °C. Larutan NA dituangkan dalam cawan petri steril, dicampurkan masing-masing dengan 0,1 mL larutan bakteri *Staphylococcus aureus* kemudian dihomogenkan dan dibiarkan hingga memadat. Ekstrak dan fraksi daun beluntas dibuat dalam berbagai konsentrasi (5, 10, 15, 20, dan 25 %).

Disiapkan kertas cakram dengan diameter 6 mm yang telah disterilkan, direndam dalam larutan ekstrak daun beluntas, DMSO sebagai kontrol negatif dan ciprofloxacin sebagai kontrol positif. Diambil kertas cakram kemudian diletakan diatas medium padat (NA) menggunakan pinset dan ditekan sedikit. Diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam (Khoiriyah, 2014). Jika terdapat aktivitas antibakteri maka akan ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening disekitar kertas cakram.

Uji aktivitas antibakteri dengan variasi konsentrasi dilakukan dengan dua ulangan secara *triplo*. Diamati zona hambat yang terbentuk dan diukur diameternya menggunakan jangka sorong untuk menentukan aktivitas antibakteri dengan menunjukkan zona bening. Sampel yang mempunyai aktivitas antibakteri dilihat pada luas zona bening yang ditunjukkan dengan persamaan 3.3

$$\text{Zona hambat} = \text{Zona hambat keseluruhan} - \text{diameter cakram} \dots\dots\dots (3.3)$$

Hasil dari pengukuran zona hambat dibandingkan dengan kriteria kekuatan daya hambat bakteri sesuai dengan besar zona hambatnya dapat diketahui pada Tabel 3.1 (Davis dan Stout 2009).

Tabel 3.2 Ketentuan Kekuatan Bakteri

| Hambat diameter | Kekuatan daya hambat |
|-----------------|----------------------|
| ≤ 5 mm | Lemah |
| 5-10 mm | Sedang |
| 10-20 mm | Kuat |
| ≥ 20 mm | Sangat kuat |

3.5.10 Analisis data

Data yang diperoleh dari penelitian pertama yaitu berupa diameter zona hambat hasil uji aktivitas antibakteri dari ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica* L.) yang dilakukan variasi konsentrasi, ekstrak yang paling efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri ditunjukkan dengan diameter zona hambat yang paling luas. Data kemudian dianalisis menggunakan SPSS. Analisis secara statistika ini digunakan untuk mempengaruhi nilai signifikan pengaruh variasi konsentrasi ekstrak dan fraksi dalam uji antibakteri *Staphylococcus aureus*.

Hasil diuji berdasarkan dua aspek yaitu uji f dan uji probabilitas (p Value/sig.). Pada pengujian nilai f dinyatakan $f_{hitung} > f_{tabel}$ maka perakuan ekstrak dan fraksi terdapat pengaruh atau beda nyata dengan perlakuan lain. Uji probabilitas dinyatakan jika signifikan (sig) kurang dari alfa (0,05) maka terdapat pengaruh ekstrak dan fraksi dan sebaliknya untuk mengetahui pengaruh konsentrasi terhadap aktivitas antibakteri *Staphylococcus aureus*.

Selanjutnya dilakukan uji lanjut yaitu uji perbandingan berganda (uji lanjut) dengan menggunakan metode statistik uji beda nyata terkecil (BNt) atau disebut juga *Least Significance Test* (LSD). Uji ini dilakukan untuk mengetahui hasil dinyatakan signifikan atau terdapat minimal 1 pasang perlakuan yang memiliki pengaruh yang berbeda. Uji BNt dinotasikan dengan huruf yang sama menunjukkan tidak terdapat perbedaan antara zona hambat bakteri terhadap perlakuan, sedangkan jika hurufnya berbeda maka sebaliknya.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Preparasi Sampel

Pada penelitian ini sampel daun beluntas (*Pluchea indica* L.) diperoleh dari Kedungkandang Kota Malang Provinsi Jawa Timur. Sampel yang telah diperoleh dilakukan proses preparasi meliputi pencucian, pengeringan, dan penghalusan. Pertama dilakukan pencucian sampel yang bertujuan untuk menghilangkan kotoran yang melekat. Selanjutnya, dilakukan pengeringan yang berfungsi untuk mengurangi kandungan air dalam sampel dan mencegah tumbuhnya jamur dan bakteri sehingga dapat disimpan dalam jangka waktu yang lama. Kemudian tahap terakhir dilakukan pengeringan. Proses ini tidak dilakukan menggunakan oven maupun sinar matahari langsung melainkan dengan cara dikeringangin, karena untuk menghindari terjadinya kerusakan senyawa aktif yang diinginkan (Dharma, dkk., 2020).

Sampel daun beluntas yang telah kering dihaluskan agar luas permukaan sampel semakin besar sehingga kontak antara sampel dengan pelarut semakin maksimal. Semakin besar kontak antara serbuk sampel dengan pelarut dapat mempercepat rusaknya dinding sel, sehingga mempermudah pengambilan senyawa aktif oleh pelarut tertentu (Noviantari, dkk., 2017). Sampel kering daun beluntas yang telah digiling dan diayak dengan ukuran 90 mesh menghasilkan sebanyak 340 gram serbuk kering dari 6 kg sampel basah, sehingga diperoleh rendemen sebesar 5,6%.

4.2 Penentuan Kadar Air

Kadar air yang rendah pada suatu sampel memiliki keuntungan yang besar terhadap proses ekstraksi. Karena dapat mempermudah penarikan senyawa aktif dalam sampel serta pelarut akan mudah menembus dinding sel pada sampel (Khoiriyah, dkk., 2014). Selain itu, kandungan air dalam sampel juga dapat mempengaruhi penyimpanan sampel. Sampel dengan kadar yang rendah cenderung tidak mudah ditumbuhi mikroorganisme sehingga dapat disimpan dalam waktu yang lama dan tidak merusak komposisi kimia di dalamnya (Abdullah, dkk., 2017).

Tabel 4.1 Hasil kadar air daun beluntas (*Pluchea indica* L.)

| Ulangan Cawan | Berat cawan kosong (g) | Berat cawan Kosong + sampel (g) | | Rata-rata Kadar air (%) |
|---------------|------------------------|---------------------------------|----------------|-------------------------|
| | | Sebelum dioven | Setelah dioven | |
| 1 | 53,9708 | 54,9708 | 54,9038 | 6,69 |
| 2 | 53,4239 | 54,4239 | 54,3565 | 6,74 |
| 3 | 53,6976 | 54,6976 | 54,6276 | 6,99 |
| Rata-rata : | | | | 6,81 |

Berdasarkan Tabel 4.1 rata-rata pengukuran kadar air pada sampel daun beluntas sebesar 6,81% (Lampiran 4). Nilai kadar air yang diperoleh menunjukkan dibawah 10%, hasil tersebut memenuhi persyaratan standar kadar air pada sediaan obat tradisional Indonesia yang terdapat dalam Depkes RI (1994). Sehingga hasil penelitian tersebut tidak melebihi ambang batas maksimum yang telah ditetapkan. Semakin kecil kadar air yang diperoleh maka proses penarikan senyawa aktif oleh pelarut akan lebih maksimal. Jika nilai kadar air tinggi, maka akan mempengaruhi proses penyimpanan dan pertumbuhan mikroorganisme yang dapat mendekomposisi senyawa aktif dalam sampel serta mempercepat proses pembusukan (Abdullah, dkk., 2017).

4.3 Ekstraksi Sampel

Ekstraksi senyawa aktif pada daun beluntas dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol. Pemilihan metanol sebagai pelarut didasarkan pada prinsip *like dissolved like*. Senyawa metabolit sekunder pada bahan alam umumnya masih terikat dengan gugus glikosidanya, gugus hidroksil yang ada pada glikosida akan membuat senyawa metabolit sekunder bersifat polar. Oleh karena itu, metanol yang merupakan pelarut polar dipilih karena dapat mengekstrak senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada sampel daun beluntas. Selain itu metode ekstraksi yang digunakan ialah metode ekstraksi maserasi. Metode ini dipilih karena tidak menggunakan suhu tinggi/pemanasan berlebih sehingga tidak merusak komponen-komponen aktif dalam sel daun beluntas.

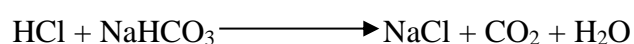
Pada proses maserasi menggunakan *shaker* yang bertujuan untuk memaksimalkan kontak antara sampel dan pelarut. Cairan pelarut pada proses maserasi akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif. Hal tersebut dikarenakan terjadi perbedaan konsentrasi antara larutan didalam dan diluar sel, sehingga larutan yang berada didalam sel akan terdesak keluar (Kurniawati, dkk., 2016). Pada proses ini dilakukan penggantian pelarut setiap pengulangan, penggantian pelarut akan dihentikan apabila warna filtrat yang dihasilkan telah berwarna pudar (hijau pudar). Hal tersebut diasumsikan bahwa zat aktif yang berada dalam sampel sudah terkestrak sempurna pada pelarut sebelumnya.

Ekstraksi daun beluntas dilakukan penggantian pelarut sebanyak 7 kali. Filtrat yang diperoleh dipekatkan menggunakan *rotary evaporator*, kemudian dialiri gas N₂ yang berfungsi untuk menghilangkan sisa pelarut yang masih ada.

Hasil penelitian ini diperoleh berat sampel sebesar 10,27 g dan nilai rendemen ekstrak pekat metanol sebesar 20,54% (Lampiran 4). Penelitian yang dilakukan Widyawati (2012) menghasilkan nilai rendemen ekstrak metanol daun beluntas sebesar 15,22%. Sehingga hasil rendemen dalam penelitian ini lebih besar dari penelitian sebelumnya. Hal tersebut dapat dipengaruhi oleh kondisi tanah, iklim, dan cara pemeliharaan tanaman.

4.4 Hidrolisis

Senyawa metabolit sekunder pada tanaman umumnya masih berikatan dengan gugus glikosida yaitu gabungan antara gugus gula (glikon) dan senyawa metabolit sekunder (aglikon). Proses hidrolisis diperlukan untuk memutus ikatan antara gugus gula dan senyawa metabolit sekunder sehingga diperoleh senyawa metabolit sekunder secara maksimal tanpa adanya gugus gula (glikon). Proses tersebut dilakukan dengan penambahan larutan asam berupa asam klorida (HCl) 2N yang berfungsi sebagai katalis serta bersifat *reversible*, maka perlu dihentikan dengan cara penetralan hingga larutan mencapai pH 7 menggunakan natrium bikarbonat (NaHCO₃). Gambar reaksi penetralan antara HCl dan NaHCO₃ ditunjukkan pada Gambar 4.1. Proses penetralan tersebut ditandai dengan terbentuknya busa atau gelembung-gelembung gas karbon dioksida (CO₂) yang mengidentifikasi bahwa HCl dan NaHCO₃ telah bereaksi dan glikosida bersifat stabil dan netral (Fessenden dan Fessenden, 1986).



Gambar 4.1 Reaksi HCl dan natrium bikarbonat (NaHCO₃)

4.5 Ekstraksi Cair-cair

Ekstrak daun beluntas yang diperoleh dari hasil hidrolisis dilanjutkan dengan proses ekstraksi cair-cair untuk memisahkan senyawa berdasarkan distribusi suatu zat diantara dua larutan yang tidak saling bercampur. Pada proses ekstraksi cair-cair ini menghasilkan dua fase larutan berupa fase organik dan fase air yang tidak saling bercampur. Hal tersebut disebabkan adanya tingkat kepolaran masing-masing pelarut yang berbeda. Fase organik berada pada lapisan atas sedangkan fase air berada di bawah. Pada penelitian ini diduga kedua fase yang diperoleh mengandung senyawa metabolit sekunder. Fase organik yang didapatkan dilakukan pemekatan dengan dialiri oleh gas N₂ sedangkan fase air menggunakan oven untuk memperoleh ekstrak pekat hasil fraksinasi.

Tabel 4.2 Hasil partisi dan rendemen fraksi

| Pelarut | Warna Filtrat | Warna Ekstrak Pekat | Rendemen (%) |
|-------------------|----------------------|----------------------------|---------------------|
| Air | Coklat Kekuningan | Coklat kekuningan | 44,17 |
| Etil asetat | Hijau Kecoklatan | Hijau kecoklatan | 39,68 |
| <i>n</i> -Heksana | Hijau Kehitaman | Hijau Kehitaman | 16,15 |

Berdasarkan Tabel 4.2 dapat diketahui bahwa rendemen fraksi air lebih besar dari pada fraksi *n*-heksana dan etil asetat (Lampiran 4). Hal tersebut diduga bahwa kandungan golongan senyawa metabolit sekunder yang bersifat polar dalam daun beluntas lebih banyak dari senyawa semi polar maupun non polar. Sesuai dengan penelitian Marsasi (2019) menunjukkan bahwa hasil rendemen hasil partisi dari ekstrak metanol daun beluntas menggunakan pelarut air 37,36%, pelarut etil asetat sebesar 36,26%, dan pelarut *n*-heksana sebesar 26,37% sehingga dapat disimpulkan

bahwa daun beluntas cenderung memiliki senyawa metabolit sekunder yang bersifat polar. Hal tersebut ditunjukkan dengan hasil rendemen fraksi air yang lebih besar, dimana semakin besar nilai rendemen maka semakin banyak kandungan senyawa aktif yang diperoleh (Senduk, dkk., 2020).

4.6 Uji Fitokimia Golongan Senyawa Aktif

Identifikasi golongan senyawa aktif pada daun beluntas dilakukan secara kualitatif yaitu dengan uji fitokimia. Uji fitokimia dilakukan untuk mengetahui golongan senyawa aktif pada daun beluntas yang dapat memberikan aktivitas antibakteri. Golongan senyawa aktif yang diuji adalah steroid, triterpenoid, flavonoid, saponin, tanin, dan alkaloid. Berdasarkan hasil penelitian dan pengamatan pada uji fitokimia ekstrak dan fraksi daun beluntas pada Tabel 4.3.

Tabel 4.3 Uji fitokimia ekstrak dan fraksi daun beluntas (*Pluchea indica* L.)

| Golongan Senyawa Aktif | Ekstrak dan Fraksi Daun Beluntas | | | |
|------------------------|----------------------------------|--------------------------|--------------------|------------|
| | Ekstrak Metanol | Fraksi <i>n</i> -Heksana | Fraksi Etil Asetat | Fraksi Air |
| Triterpenoid | + | + | + | - |
| Steroid | + | + | + | - |
| Flavonoid | + | - | + | + |
| Saponin | + | - | + | + |
| Tanin | + | - | + | + |
| Alkaloid | | | | |
| a. Mayer | + | - | - | - |
| b. Dragendorff | + | - | - | - |

Keterangan: Tanda + menunjukkan terkandung senyawa aktif dan tanda - menunjukkan tidak terkandung senyawa aktif.

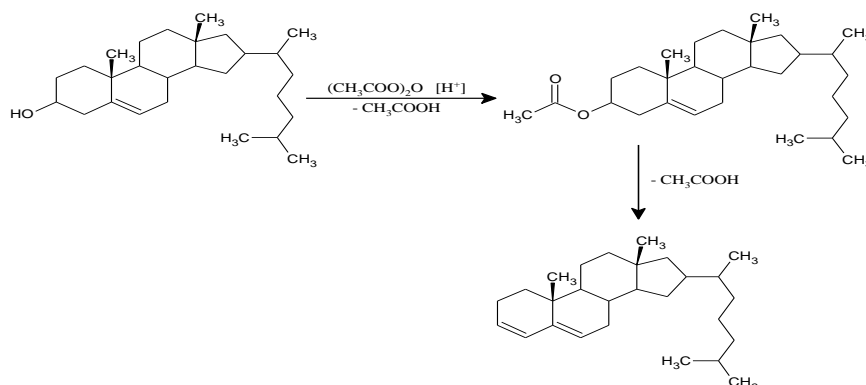
Hasil uji fitokimia pada Tabel 4.3 menunjukkan bahwa ekstrak metanol pada sampel daun beluntas diduga terdapat golongan senyawa steroid, triterpenoid, flavonoid, saponin, tanin, dan alkaloid. Pada fraksi air terdapat flavonoid, saponin,

dan tanin, sedangkan fraksi etil asetat terdapat senyawa steroid, flavonoid, saponin, dan tanin, serta fraksi *n*-heksana hanya mengandung senyawa steroid dan triterpenoid. Pada penelitian Widyawati (2012) yang melakukan pemisahan senyawa aktif menggunakan ekstrak metanol serta fraksi etil asetat dan air menunjukkan hasil uji fitokimia yang sesuai yaitu positif mengandung senyawa flavonoid dan tanin. Selain itu pada ekstrak metanol juga positif mengandung saponin, steroid, triterpen, dan tanin

4.6.1 Triterpenoid dan Steroid

Uji golongan senyawa steroid dan triterpenoid menggunakan pereaksi *Lieberman-Bouchard*, yaitu dilakukan dengan penambahan kloroform, asam asetat anhidrat, dan asam sulfat. Sampel terlebih dahulu diambil sedikit dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan pereaksi melalui dinding-dinding tabung reaksi. Menurut Robinson (1995) pada senyawa triterpenoid ketika ditetesi pereaksi *Lieberman-Burchard* melalui dindingnya akan menghasilkan reaksi berupa cincin kecoklatan, sedangkan pada steroid akan terbentuk warna hijau kebiruan. Hal tersebut didasari oleh kemampuan kedua senyawa tersebut membentuk warna oleh asam sulfat (H_2SO_4) dalam pelarut asam asetat anhidrat (Simaremare, 2014). Berdasarkan hasil fitokimia, diketahui bahwa ekstrak metanol, fraksi etil asetat, dan fraksi *n*-heksana positif mengandung senyawa steroid dan triterpenoid. Hasil positif senyawa steroid ditandai dengan adanya perubahan warna menjadi hijau kebiruan. Hal tersebut terjadi karena penambahan kloroform yang berfungsi untuk melarutkan senyawa steroid yang terkandung dalam sampel, serta asam asetat anhidrat berfungsi untuk membentuk gugus asetil. Penambahan asam

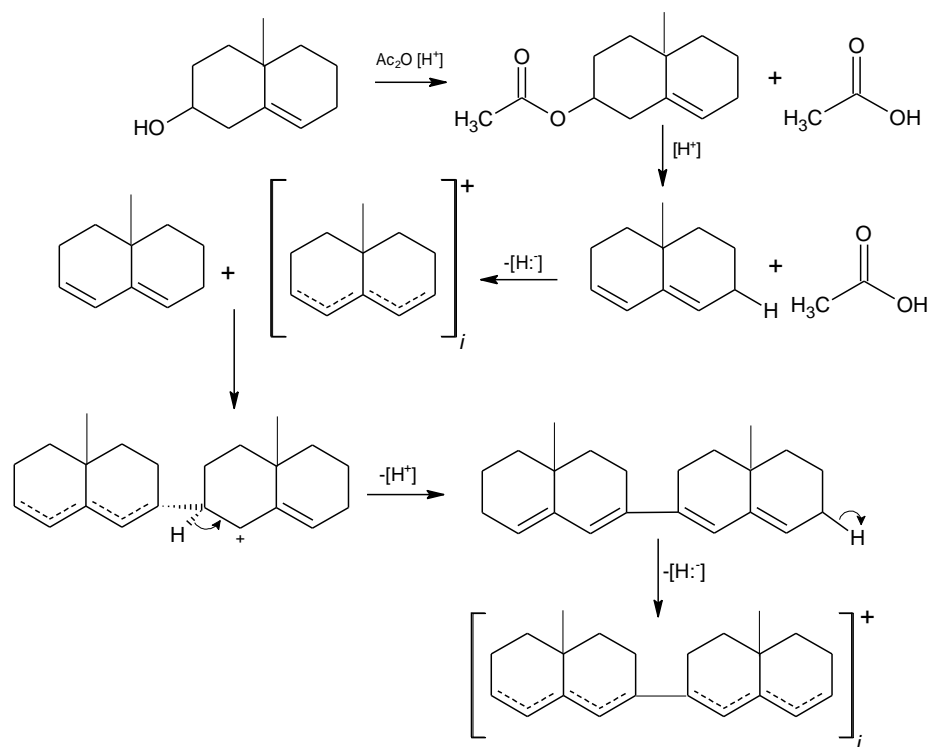
sulfat pekat menyebabkan dehidrasi pada senyawa steroid. Selanjutnya terjadi reaksi oksidasi melalui pembentukan ikatan rangkap terkonjugasi sehingga terbentuk warna hijau kebiruan (Sholikhah, 2016).



Gambar 4.2 Dugaan reaksi uji senyawa steroid (Sahriawati, dkk., 2020)

Hasil positif senyawa triterpenoid ialah terbentuknya cincin coklat pada batas larutan ketika ditambah dengan asam sulfat (H_2SO_4). Perubahan ini terjadi karena adanya reaksi oksidasi pada golongan senyawa terpenoid melalui pembentukan ikatan rangkap terkonjugasi yang menghasilkan gugus kromofor. Hal ini disebabkan oleh adanya reaksi pelepasan gugus H_2O pada reaksi kondensasi dan penggabungan dengan karbokation. Reaksi yang terjadi dimulai dengan proses asetilasi gugus hidroksil menggunakan asam asetat anhidrat. Kemudian gugus asetil akan terlepas (proses eliminasi) membentuk ikatan rangkap terkonjugasi. Selanjutnya gugus hidrogen akan mengalami pelepasan beserta elektronnya membentuk ikatan rangkap, posisi ikatan rangkap mengalami perpindahan. Senyawa ini akan mengalami resonansi yang bertindak sebagai elektrofilik atau hidrokarbon. Serangan karbokation menyebabkan adisi elektrofilik yang diikuti adanya pelepasan atom hidrogen, yang mengakibatkan terjadinya penggabungan

cincin segi enam tak jenuh. Sehingga ikatan rangkap terkonjugasi semakin memanjang (Siadi, 2012). Reaksi dugaan senyawa triterpenoid ditunjukkan pada Gambar 4.3.



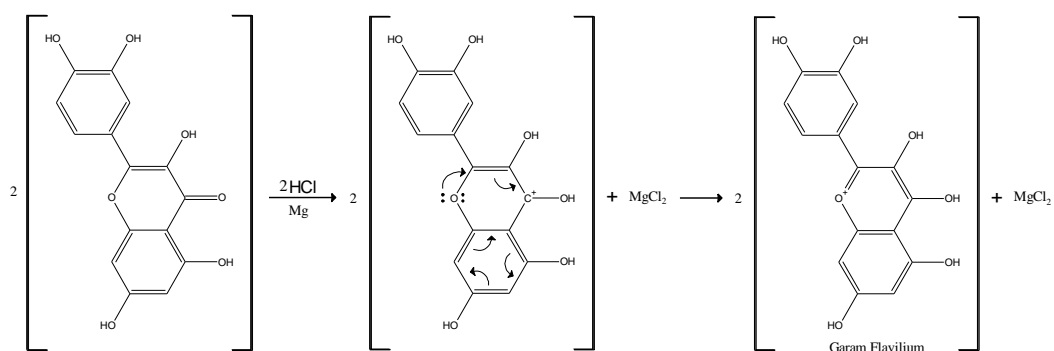
Gambar 4.3 Dugaan reaksi uji senyawa triterpenoid (Siadi, 2012)

4.6.2 Flavonoid

Uji golongan senyawa flavonoid dilakukan dengan mengambil sedikit ekstrak dan fraksi daun beluntas dan dilarutkan menggunakan metanol panas 50% yang berfungsi untuk melarutkan ekstrak. Kemudian ditambahkan sedikit serbuk Mg bertujuan agar gugus karbonil flavonoid berikatan dengan Mg dan penambahan HCl pekat untuk menghidrolisis flavonoid menjadi aglikonnya yaitu menghidrolisis O-glikosil. Glikosil akan tergantikan oleh H^+ dari asam karena sifatnya yang elektrofilik. Reduksi dengan Mg dan HCl pekat akan menghasilkan senyawa

komplek berupa garam flavilium yang berwarna merah, kuning atau jingga pada flavonol, flavanon, flavanonol, dan xannton (Ikalinus, dkk., 2015).

Hasil pengujian ekstrak metanol, fraksi etil asetat dan fraksi air daun beluntas pada senyawa flavonoid menunjukkan hasil positif mengandung flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna jingga pada sampel. Hal tersebut dikarenakan flavonoid tergolong senyawa polar sehingga dapat larut dalam pelarut polar. Kepolaran tersebut dikarenakan flavonoid memiliki senyawa polihidroksi (memiliki lebih dari satu gugus hidroksil) (Harbone, 1987). Persamaan reaksinya ditunjukkan pada Gambar 4.4.

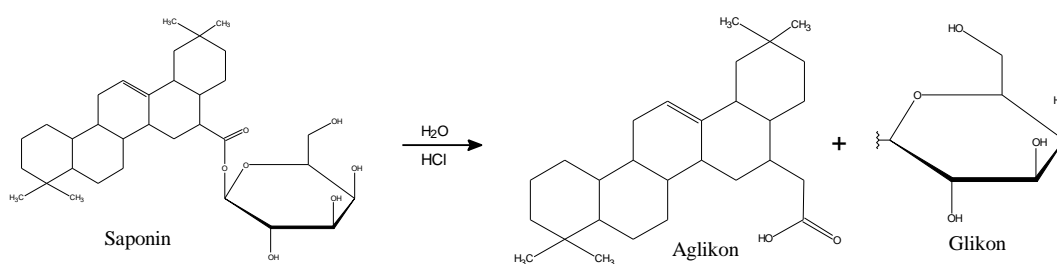


Gambar 4.4 Dugaan reaksi uji senyawa flavonoid (Illing, dkk., 2017)

4.6.3 Saponin

Identifikasi saponin dilakukan dengan uji busa, yaitu dengan penambahan aquades pada ekstrak dan fraksi daun beluntas dan dilakukan pengocokan. Kemudian ditambahkan HCl 1 N, apabila terbentuk lapisan busa yang bertahan selama 10 menit dengan ketinggian 1-3 cm maka positif mengandung senyawa saponin. Dari penelitian ini dapat diketahui bahwa ekstrak metanol, fraksi etil asetat, dan fraksi air positif mengandung senyawa saponin. Saponin merupakan suatu glikosida dengan gugus hidroksil pada molekulnya dan mengandung gugus

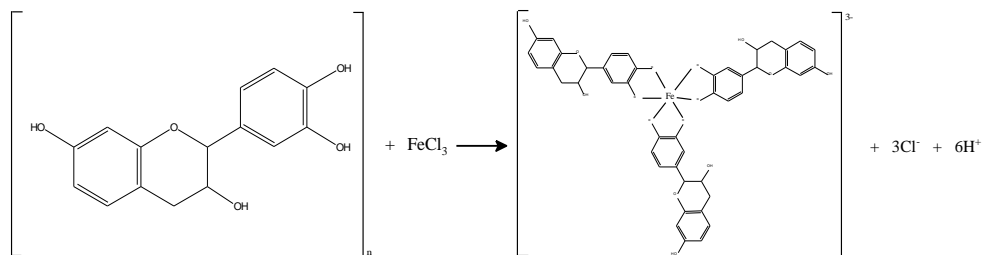
hidrofilik dan hidrofobik. Adanya gugus hidrofilik yang berikatan dengan air sedangkan gugus hidrofobik yang akan berikatan dengan udara sehingga membentuk misel. Timbulnya busa pada uji senyawa saponin dikarenakan adanya gugus glikosida yang terhidrolisis menjadi glukosa dan senyawa lain senyawa saponin cenderung tertarik pada senyawa semi polar (Astarina, dkk., 2013). Dugaan reaksi yang terjadi pada saponin seperti pada Gambar 4.5.



Gambar 4.5 Dugaan reaksi uji senyawa saponin (Illing, dkk., 2017)

4.6.4 Tanin

Pengujian golongan senyawa tanin dilakukan dengan cara menambahkan larutan FeCl_3 . Penambahan FeCl_3 berfungsi untuk menentukan adanya gugus fenol dalam sampel. Dugaan senyawa fenol ditunjukkan dengan adanya perubahan warna menjadi hijau kehitaman atau biru tua. Hal tersebut terjadi karena golongan senyawa polifenol mampu mereduksi besi (III) menjadi besi (II) dengan membentuk senyawa kompleks dengan ion Fe^{3+} (Ergina, dkk., 2014). Pada penelitian ini hasil ekstrak metanol dan fraksi etil asetat daun beluntas menunjukkan positif adanya kandungan senyawa tanin. Persamaan reaksi antara senyawa tanin dan FeCl_3 terdapat pada Gambar 4.6.

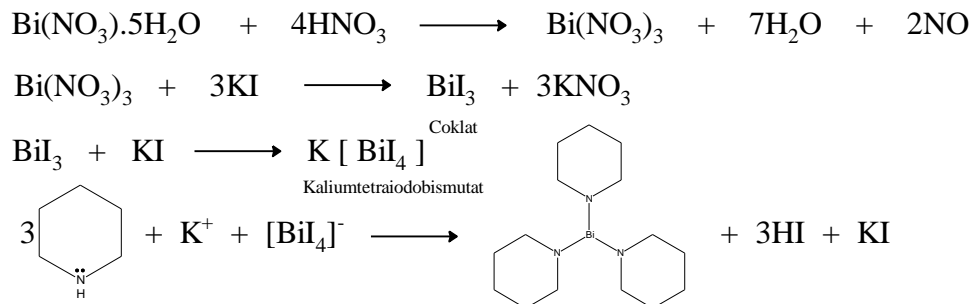


Gambar 4.6 Dugaan reaksi uji senyawa tanin (Illing, dkk., 2017)

4.6.5 Alkaloid

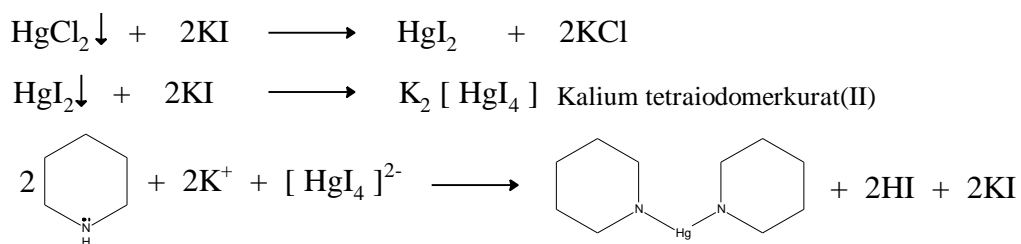
Uji alkaloid pada ekstrak dan fraksi daun beluntas menggunakan reagen pereaksi berupa Dragendorff dan Mayer. Pengujian ini dilakukan dengan penambahan HCl terlebih dahulu. Hal ini bertujuan untuk meningkatkan kelarutan senyawa alkaloid karena senyawa tersebut akan bereaksi dengan HCl yang membentuk produk berupa garam yang mudah larut dalam air (Harbone, 1987). Selain itu alkaloid memiliki sifat basa sehingga diperlukan larutan yang bersifat asam, salah satunya HCl (Harbone, 1987).

Reagen Dragendorff terdiri atas bismuth nitrat dengan kalium iodide yang akan membentuk endapan bismuth (III) iodide, kemudian dilarutkan dalam pelarut iodide berlebih membentuk kalium tetraiodobismutat (Sulistyarini, dkk., 2020). Prinsip dari metode analisis ini adalah reaksi pengendapan yang terjadi karena adanya penggantian ligan. Atom nitrogen yang mempunyai pasangan elektron bebas pada senyawa alkaloid dapat membentuk ikatan kovalen koordinasi dengan membentuk ion K^+ dari kalium tetraiodobismutat yang menghasilkan produk berupa kompleks kalium-alkaloid yang mengendap (garam) (Agustina, dkk., 2016). Berikut dugaan reaksi alkaloid dengan pereaksi Dragendorff ditunjukkan pada Gambar 4.7.



Gambar 4.7 Dugaan reaksi uji alkaloid preaksi Dragendorff (Sriwahyuni, 2010)

Reagen Mayer dibuat dari larutan merkuri (II) klorida ditambah dengan kalium iodide. Kemudian akan menghasilkan produk berupa merkuri (II) iodide dengan membentuk endapat berwarna merah yang diperoleh dari hasil reaksi kompleks kalium-alkaloid. Jika kalium iodida yang ditambahkan berlebih maka akan terbentuk kalium tetraiodomerkurat (II). Pada uji alkaloid dengan pereaksi Mayer akan terjadi reaksi antara nitrogen dengan ion kalium (K^+) membentuk kompleks kalium alkaloid yang mengendap (Agustina, dkk., 2016). Hasil uji fitokimia diketahui bahwa pada ekstrak metanol positif adanya alkaloid, sedangkan fraksi daun beluntas negatif mengandung golongan senyawa alkaloid. Sehingga dapat disimpulkan bahwa pada daun beluntas sedikit mengandung adanya senyawa alkaloid didalamnya. Hal tersebut ditunjukkan dengan tidak terbentuknya endapan pada reagen pereaksi Dragendorff maupun Mayer. Berikut dugaan reaksi alkaloid dengan pereaksi Mayer ditunjukkan pada Gambar 4.8.



Gambar 4.8 Dugaan reaksi uji alkaloid pereaksi Mayer (Sriwahyuni, 2010)

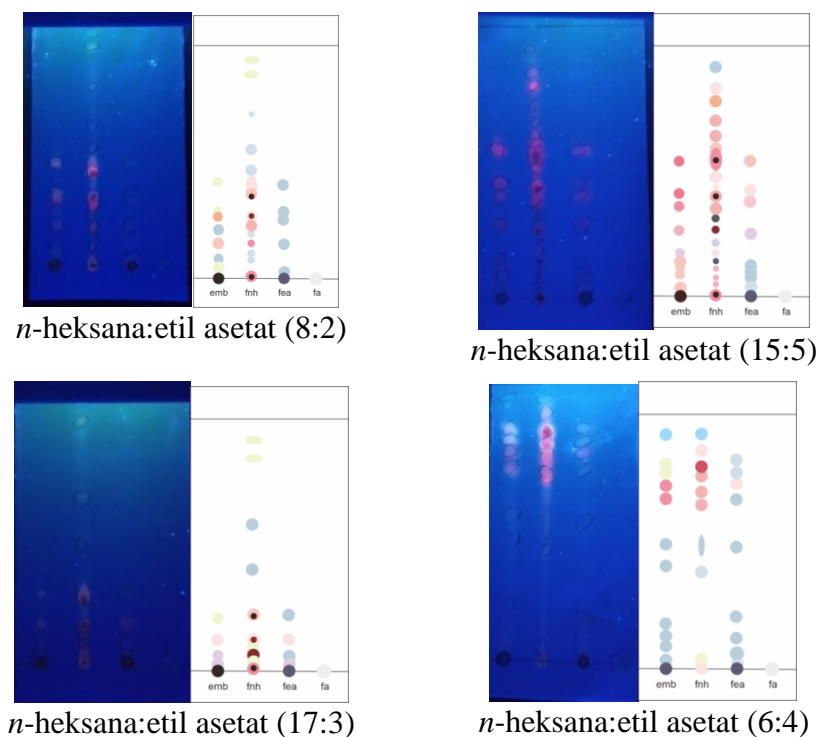
4.7 Uji Senyawa Aktif dengan Kromatografi Lapis Tipis Analitik

Analisis menggunakan KLTA digunakan untuk mempertegas hasil yang diperoleh dari uji fitokimia dan memisahkan senyawa metabolit sekunder berdasarkan eluen terbaik dari beberapa eluen yang sudah digunakan. Kepolaran suatu senyawa disebabkan oleh perbedaan struktur senyawanya, dimana senyawa bersifat polar cenderung tertahan pada fase diam (silika) sedangkan senyawa non polar akan lebih terdistribusi pada fase geraknya (eluen) (Effendy, 2010).

Hasil identifikasi KLTA dugaan senyawa steroid dan terpenoid dengan variasi eluen pada L.5.1 menunjukkan hasil pemisahan terbaik yaitu pada eluen *n*-heksana:etil asetat pada perbandingan 8:2. Hal ini dikarenakan kepolaran eluen yang digunakan mirip senyawa target yang diinginkan, menghasilkan pola pemisahan yang tepat dibanding yang lainnya, karena noda yang terduga steroid terlihat jelas pada ekstrak dan fraksi serta jarak antar noda terlihat jelas tidak berekor. Selain itu senyawa tidak tertahan oleh plat silika yang bersifat polar, sehingga berinteraksi langsung dengan eluennya dan menghasilkan spot noda yang terlihat jelas antara jarak antar noda dengan jumlah noda yang dihasilkan lebih banyak yaitu pada ekstrak metanol, fraksi etil asetat, *n*-heksana, dan air sebanyak 8, 6, 14 dan 1 noda yang diduga dimiliki senyawa steroid. Pada eluen yang sama dengan perbandingan 17:3 menghasilkan jumlah noda sedikit sehingga senyawa steroid yang dihasilkan diduga berjumlah sedikit serta memiliki jarak antar noda yang terlalu dekat sedangkan pada perbandingan 6:4 diperoleh jarak antar noda terlihat jelas, serta menghasilkan jumlah noda tertinggi pada ekstrak metanol dan fraksi etil asetat. Hasil tersebut menunjukkan bahwa senyawa aktif yang terkandung pada ekstrak maupun fraksi memiliki kepolaran yang sesuai dengan eluennya.

Senyawa steroid akan menghasilkan warna biru dan hijau saat diamati dibawah lampu UV λ 366 nm (Pratiwi, 2014). Hasil yang diperoleh didukung oleh Sulastry (2010) yang menyatakan bahwa eluen *n*-heksana:etil asetat pada perbandingan 8:2 merupakan eluen terbaik untuk pemisahan senyawa steroid dari ekstrak dan fraksi daun beluntas.

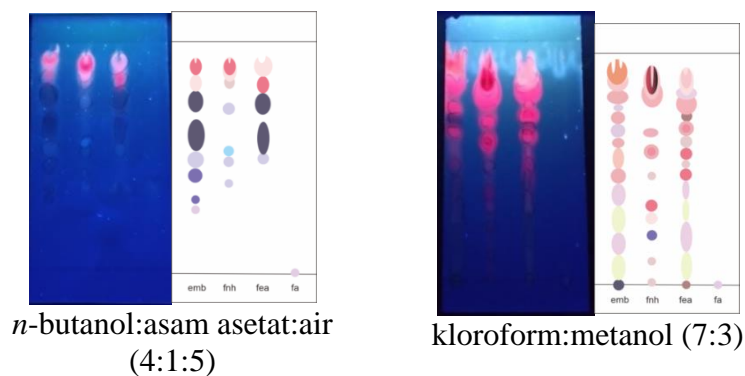
Pada senyawa triterpenoid menghasilkan pemisahan terbaik menggunakan eluen *n*-heksana:etil asetat dengan perbandingan 15:5. Hal tersebut diduga karena jumlah noda yang dihasilkan menunjukkan adanya senyawa triterpenoid berjumlah banyak, dengan jumlah noda pada ekstrak metanol, fraksi etil asetat, *n*-heksana dan air masing-masing sebanyak 9, 4, 17 dan 1 noda. Noda yang dihasilkan sedikit berekor, dimungkinkan waktu penotolan kurang sempurna sehingga hasil yang diperoleh kurang maksimal. Serta senyawa yang dihasilkan tidak tertahan oleh plat silika, dimana senyawa berinteraksi langsung dengan eluennya. Pada perbandingan 6:4 menghasilkan jumlah noda senyawa steroid terbanyak terdapat fraksi etil asetat, serta noda berwarna kurang jelas dan senyawa terangkat dengan baik sedangkan eluen dengan perbandingan 17:3 menghasilkan noda yang diduga senyawa triterpenoid berjumlah sedikit, dimana senyawa aktif pada setiap ekstrak dan fraksi akan terpisahkan dengan baik jika memiliki kepolaran yang sesuai dengan eluennya. Hal tersebut terjadi karena senyawa yang akan dipisahkan kurang berinteraksi dengan eluen yang digunakan. Hasil pemisahan senyawa steroid dan triterpenoid dengan beberapa variasi eluen pada KLTA ditunjukkan pada Gambar 4.9.



Gambar 4.9 Hasil KLTA senyawa steroid dan triterpenoid ekstrak metanol (m), fraksi etil asetat (ea), fraksi *n*-heksana (n-h), dan fraksi air (a) daun beluntas.

Senyawa terpenoid akan menampilkan bercak noda berwarna merah ungu, ungu tua atau merah muda saat diamati dibawah lampu UV λ 366 nm. Hasil dari penelitian ini didukung oleh Masrihanah (2020) yang menyatakan bahwa eluen *n*-heksana:etil asetat pada perbandingan 15:5 merupakan eluen terbaik untuk pemisahan senyawa terpenoid dari ekstrak daun Katuk.

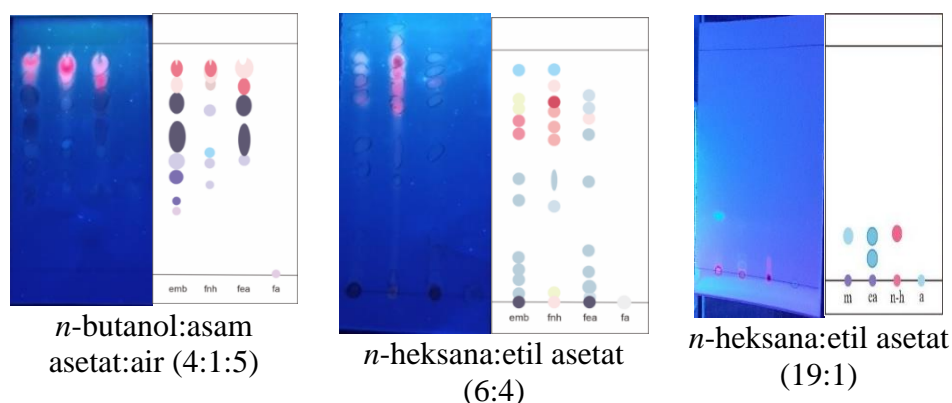
Senyawa flavonoid bernilai positif jika noda yang dihasilkan pada plat KLT ketika disinari lampu UV 366 nm menunjukkan warna ungu (Rusdi, dkk., 2018), kuning dan kelabu (Markham, 1988), serta warna merah jingga (Robinson, 1995).



Gambar 4.10 Hasil KLTA senyawa flavonoid ekstrak metanol (m), fraksi etil setat (ea), fraksi *n*-heksana (n-h), dan fraksi air (a) daun beluntas.

Hasil identifikasi KLTA senyawa flavonoid pada ekstrak dan fraksi daun beluntas pada L.5.2 diperoleh bahwa pemisahan terbaik terdapat pada eluen *n*-butanol:asam asetat:air (4:1:5). Hal tersebut ditunjukkan dengan hasil noda pada Gambar 4.15 yang memiliki jumlah noda senyawa flavonoid lebih banyak, pada ekstrak metanol fraksi etil asetat, *n*-heksana sebanyak 14, 15, 12, dan 1 noda serta jarak noda terlihat dengan jelas. Selain itu, eluen yang digunakan cenderung bersifat polar sehingga dimungkinkan senyawa flavonoid dapat berinteraksi dengan fase gerak. Pada eluen kloroform:metanol (7:3) noda yang dihasilkan berekor dan spot noda yang mengalami tumpang tindih dengan noda yang diduga senyawa triterpenoid. Hal tersebut dikarenakan eluen yang digunakan cenderung bersifat non polar, sehingga senyawa non polar yang lebih berinteraksi dengan eluennya. Kedua eluen tersebut memiliki kesamaan yaitu spot noda yang dihasilkan sedikit berekor, hal tersebut dimungkinkan pada proses penotolan kurang sempurna sehingga jarak antar noda tidak terpisah dengan sempurna. Pada penelitian Koirewoa, dkk., (2012) yang menyatakan bahwa eluen *n*-butanol:asam asetat:air pada perbandingan 4:1:5 merupakan eluen terbaik untuk pemisahan senyawa flavonoid dari ekstrak daun beluntas.

Identifikasi senyawa tanin pada KLTA menunjukkan bercak noda berwarna ungu atau ungu kemerahan pada sinar tampak menunjukkan adanya golongan senyawa tanin (Saifudin, 2014). Hasil KLTA menunjukkan noda dugaan senyawa tanin ditunjukkan pada Gambar 4.11.

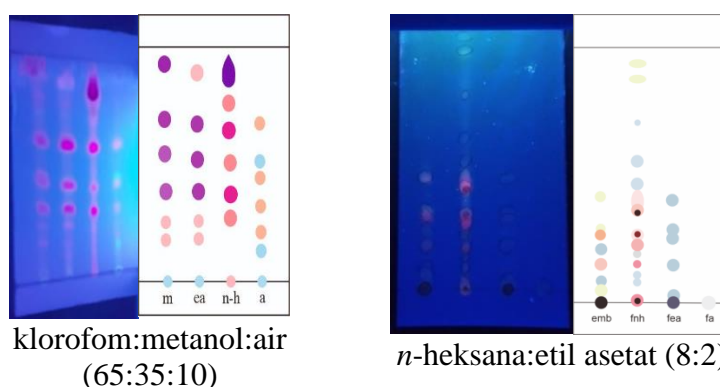


Gambar 4.11 Hasil KLTA senyawa tanin ekstrak metanol (m), fraksi etil asetat (ea), fraksi *n*-heksana (n-h), dan fraksi air (a) daun beluntas.

Berdasarkan hasil KLTA pada L.5.3 pada ekstrak dan fraksi daun beluntas menghasilkan pemisahan terbaik senyawa tanin yaitu menggunakan eluen *n*-butanol:asam asetat:air 4:1:5. Hal tersebut ditunjukkan dengan hasil spot noda yang lebih banyak, pada ekstrak metanol, fraksi etil asetat, *n*-heksana sebesar 5, 3, 7 dan 1 noda. Noda yang diperoleh sedikit berekor, dikarenakan pada proses penotolan yang tidak sempurna. Selain itu, eluen yang digunakan cenderung bersifat polar, sehingga memungkinkan senyawa yang bersifat polar (tanin) lebih berinteraksi dengan fase gerak. Hasil pemisahan dengan eluen *n*-heksana:etil asetat 6:4 noda yang dihasilkan terangkat dengan baik, namun noda yang diperoleh diduga senyawa triterpenoid. Pada eluen yang sama dengan perbandingan 19:1, dimana noda yang diduga senyawa tanin berjumlah paling sedikit daripada variasi eluen lainnya, dikarenakan spot noda tertahan pada fase diamnya. Hal tersebut dikarenakan

senyawa yang ingin dipisahkan memiliki tingkat kepolaran yang berbeda dengan eluen yang digunakan. Selain itu eluen *n*-heksana:etil asetat cenderung bersifat non polar, sehingga spot noda yang dihasilkan kecenderungannya mampu memisahkan senyawa yang bersifat non polar pula. Hasil tersebut didukung oleh Mabruroh (2015) yang menyatakan bahwa eluen *n*-butanol:asam asetat: air pada perbandingan 4:1:5 merupakan eluen terbaik untuk memisahkan senyawa tanin pada ekstrak daun rumput bambu.

Senyawa saponin pada KLTA akan menghasilkan bercak noda berwarna ungu atau ungu kegelapan, ketika disinari lampu UV 366 nm pada lempeng silika (Firawati, 2014). Hasil KLTA menunjukkan noda dugaan senyawa saponin ditunjukkan pada L.5.4.



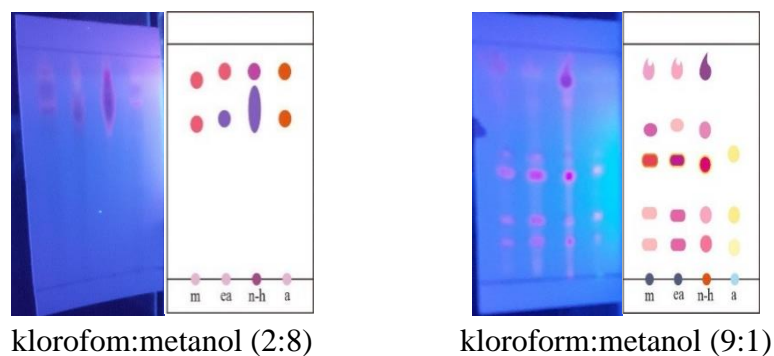
Gambar 4.12 Hasil KLTA senyawa saponin ekstrak metanol (m), fraksi etil asetat (ea), fraksi *n*-heksana (n-h), dan fraksi air (a) daun beluntas.

Berdasarkan hasil KLTA pada L.5.4 senyawa saponin pada ekstrak dan fraksi daun beluntas pemisahan terbaik menggunakan eluen kloroform:metanol:air (65:35:10) ditunjukkan dengan hasil spot noda yang lebih banyak yaitu pada ekstrak metanol, fraksi etil asetat, *n*-heksana dan air adalah 7,6,7 dan 6 noda, serta jarak antar noda terlihat jelas. Hal tersebut dikarenakan eluen yang digunakan memiliki kemiripan

kepolaran dengan senyawa yang akan dipisahkan sehingga senyawa tersebut dapat berinteraksi dengan fase gerak dengan mudah yang mana spot noda yang dihasilkan berjumlah banyak. Selain itu spot noda yang dihasilkan sedikit berekor, dikarenakan pada proses penotolan dimungkinkan kurang sempurna sehingga terjadi pelebaran pada spot nodanya. Hasil pemisahan dengan eluen *n*-heksana:etil asetat (8:2) noda yang dihasilkan terangkat dengan baik, namun noda yang diperoleh diduga senyawa saponin yang dihasilkan sedikit. Hal tersebut dikarenakan eluen yang digunakan cenderung bersifat non polar sehingga senyawa yang terpisahkan cenderung bersifat non polar pula. Hasil yang diperoleh didukung oleh Shofa (2020) yang menyatakan bahwa eluen kloroform:metanol:air (65:35:1) merupakan eluen terbaik untuk memisahkan senyawa saponin pada kitosan ekstrak temu mangga.

Hasil pemisahan KLTA senyawa alkaloid dengan variasi eluen pada Tabel L.5.5 menunjukkan pemisahan terbaik menggunakan eluen kloroform:metanol dengan perbandingan 9:1 dengan jumlah noda yang diperoleh lebih banyak yaitu pada ekstrak metanol, fraksi etil asetat, *n*-heksana dan air sebesar 4, 4, 4, dan 3 noda. Hal tersebut dikarenakan kepolaran eluen yang digunakan cenderung bersifat semi polar dimana memiliki kemiripan dengan senyawa yang akan dipisahkan. Meskipun noda yang dihasilkan berekor tetapi jarak antar noda dapat terlihat dengan jelas. Jika dibandingkan dengan perbandingan eluen 2:8 memiliki noda yang dihasilkan berjumlah lebih sedikit, berekor, dan noda yang terangkat tidak terlihat dengan jelas. Hal ini disebabkan karena eluen tersebut cenderung bersifat polar, sehingga pemisahan senyawa alkaloid cenderung menghasilkan noda berjumlah sedikit, dimana interaksi dengan fase gerak yang digunakan kurang

maksimal. Selain itu, pada fraksi etil asetat tidak menghasilkan noda terduga alkaloid, serta spot noda yang berekor diakibatkan karena proses penotolan yang kurang baik sehingga spot yang dihasilkan sedikit melebar. Hasil pemisahan KLTA pada senyawa alkaloid ditunjukkan pada Gambar 4.13.

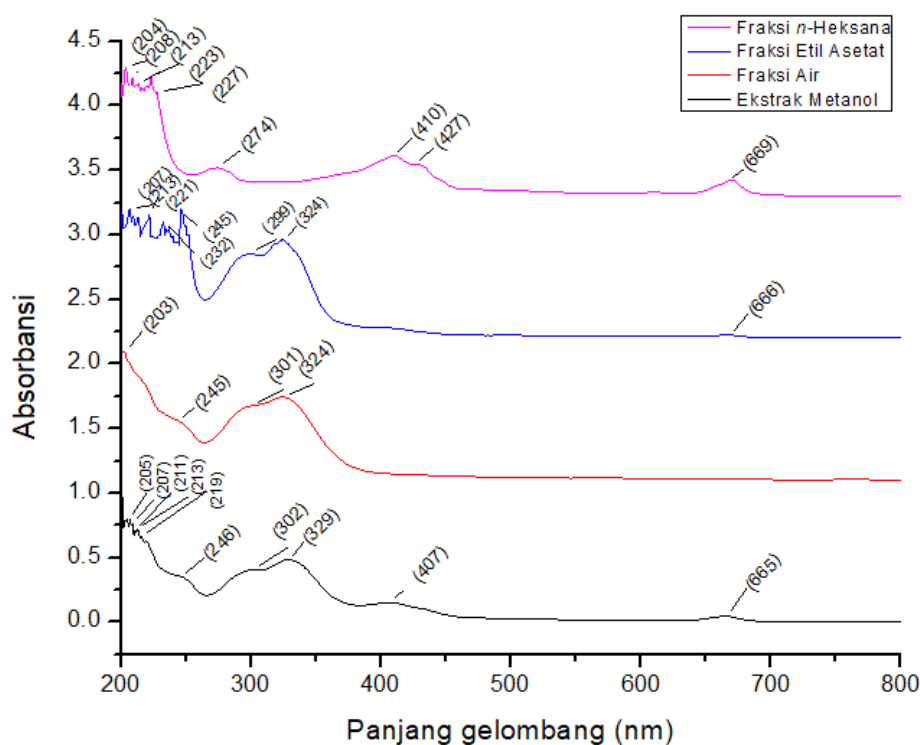


Gambar 4.13 Hasil KLTA senyawa alkaloid ekstrak metanol (m), fraksi etil asetat (ea), fraksi *n*-heksana (n-h), dan fraksi air (a) daun beluntas.

Uji adanya kandungan senyawa alkaloid pada ekstrak dan fraksi daun beluntas menggunakan KLTA untuk memastikan kembali hasil uji fitokimia yang telah dilakukan menggunakan reagen pereaksi berupa *Dragendorff* dan *Mayer*. Senyawa alkaloid akan menampakkan bercak noda berwarna kuning kemerahan (jingga) pada lampu UV λ 366 nm (Masfufah, 2016). Pada penelitian Masrihanah (2020) yang menyatakan bahwa eluen kloroform:metanol pada perbandingan 9:1 merupakan eluen terbaik untuk pemisahan senyawa alkaloid dari ekstrak daun katuk.

4.8 Identifikasi Senyawa Menggunakan Spektroskopi UV-Vis

Hasil ekstrak dan fraksi daun beluntas diidentifikasi menggunakan spektroskopi UV-Vis pada panjang gelombang 200-800 nm. Adapun hasil spektra ekstrak dan fraksi daun beluntas didapatkan panjang gelombang pada Gambar 4.14.



Gambar 4.14 Spektra UV-Vis daun beluntas

Berdasarkan hasil spektra UV-Vis pada Gambar 4.14 dapat diketahui bahwa terdapat banyak serapan panjang gelombang yang dihasilkan dari ekstrak maupun fraksi pada daun beluntas. Hal tersebut digunakan untuk merujuk hasil uji fitokimia dan KLTA yang sudah dilakukan. Namun tidak menutup kemungkinan terdapat senyawa lain pada hasil fitokimia dan KLTA yang terkandung didalam ekstrak maupun fraksi daun beluntas. Sehingga diperlukan identifikasi lanjutan menggunakan spektroskopi UV-Vis.

Hasil spektra UV-Vis pada Gambar 4.14 didapatkan hasil serapan pada panjang gelombang 203, 204, 205, 207, 208, 221, 223, 245, 246 dan 274 nm. Menurut Mashunah, dkk. (2020) hasil penelitian yang diperoleh menyatakan bahwa senyawa steroid dan triterpenoid mempunyai transisi elektron $\pi \rightarrow \pi^*$ mengindikasikan adanya ikatan rangkap C=C yang tidak terkonjugasi. Panjang gelombang maksimum yang diperoleh pada senyawa tersebut ialah 205,6 nm. Sedangkan penelitian Febriyanti, (2021) memiliki panjang gelombang maksimum senyawa steroid pada *Chlorella* sp. sebesar 204 dan 221 nm. Fasya, dkk (2019) senyawa steroid memiliki panjang gelombang maksimum 203,9 nm *Hydrilla verticillate*. Senyawa triterpenoid juga memiliki transisi elektron $n \rightarrow \pi^*$ yang disebabkan adanya gugus kromofor berupa C=O (Wahjuni, 2016). Menurut Farikhah, dkk (2020); Sutomo, dkk (2020) senyawa triterpenoid pada daun bilaran dan biji karika memiliki panjang gelombang maksimum sebesar 245 nm. Pada isolat daun *Macaranga beccariana* Merr. gelombang maksimum senyawa terpenoid sebesar 207 nm (Atmoko, dkk., 2018).

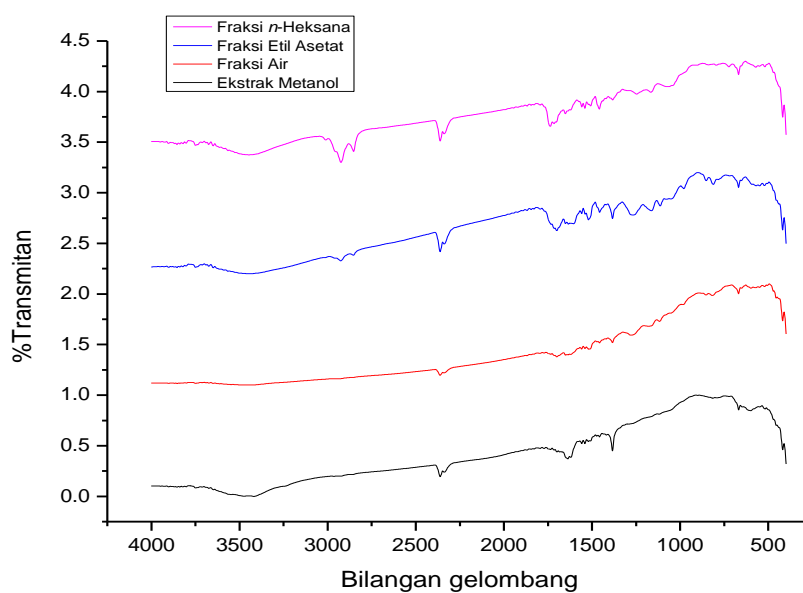
Serapan UV-Vis pada Gambar 4.14 terdapat serapan panjang gelombang 299, 301, 302, 324, 323, dan 329 nm. Menurut Markham (1988) bahwa senyawa flavonoid mempunyai 2 pita serapan, rentang serapan spektrum flavonol mempunyai panjang gelombang 350-385 nm pada pita pertama dan pita kedua pada panjang gelombang 250-280 nm. Hal tersebut ditandai adanya gugus kromofor C=O dan C=C dari gugus aromatik yang terkonjugasi sehingga menyebabkan adanya transisi elektron $\pi \rightarrow \pi^*$ dan $n \rightarrow \pi^*$ (Harbone, 1987). Menurut penelitian Mabruroh, dkk (2019) pada daun murbei memiliki panjang gelombang maksimum pada pita II 291 nm dan 324 nm pada pita I, sedangkan pada daun trembesi memiliki

pita serapan maksimum 329 nm (Rita, dkk., 2015). Pada isolat flavonoid tanaman rimpang diperoleh panjang gelombang 304 nm (Muhridja, 2016). Terdapat serapan gelombang maksimum 211 dan 213 nm pada Gambar 4.19 yang menunjukkan adanya transisi elektron dari $n \rightarrow \pi^*$ dari kromofor C=O diduga dimiliki oleh senyawa golongan saponin. Pada penelitian Rachman, dkk (2018) pada ekstrak metanol daun binahong menunjukkan panjang gelombang maksimum sebesar 211 nm. Hasil ini sesuai dengan hasil uji fitokimia yang diduga positif adanya golongan saponin.

Pada panjang gelombang 665, 666, dan 669 nm terdapat transisi $\sigma \rightarrow \pi^*$, puncak tersebut dimiliki oleh pigmen klorofil (Gibson dan Iqbal, 2017). Pada puncak klorofil terjadi dua resonansi ikatan rangkap terkonjugasi yang membentang di dalam cincin *porphyrin*. Semakin non polar sebuah pelarut maka dimungkinkan bahwa panjang gelombang klorofil yang dihasilkan semakin besar. Hal tersebut dikarenakan klorofil lebih berinteraksi dengan pelarut non polar, sehingga resonansi yang dihasilkan lebih panjang dan akan menghasilkan puncak serapan pada gelombang yang lebih tinggi dan sebaliknya (Jannah, 2020). Terdapat panjang gelombang maksimum 407, 410, dan 427 nm dimana panjang gelombang tersebut menunjukkan terdapat senyawa klorofil yang diasumsikan pigmen jenis karotenoid yang tercampur diantara pigmen klorofil. Pigmen karotenoid berada pada kisaran 380-550 nm (Nasution, 2021; Hasanela, dkk, 2021). Panjang gelombang tersebut hanya terdapat pada ekstrak metanol dan fraksi *n*-heksana karena kedua ekstrak dan fraksi tersebut pada pemisahan menggunakan KLTA menghasilkan noda berwarna hijau muda yang dimungkinkan menunjukkan terdapat klorofil dengan pigmen karotenoid.

4.9 Identifikasi Senyawa Menggunakan Spektroskopi FTIR

Hasil ekstrak metanol, fraksi etil asetat, *n*-heksana, dan air daun beluntas selanjutnya akan diidentifikasi menggunakan spektroskopi FTIR. Hasil spektra FTIR pada ekstrak dan fraksi daun beluntas ditunjukkan pada Gambar 4.15 dan Tabel 4.4.



Gambar 4.15 Spektra FTIR daun beluntas

Hasil spektra FTIR pada Gambar 4.15 menunjukkan dari ke empat ekstrak dan fraksi memiliki panjang gelombang yang sama yaitu pada serapan 3417,610; 3432,873; 3447,418; dan 3447,284 cm^{-1} yang menunjukkan adanya serapan melebar dengan intensitas sedang sebagai vibrasi ulur -OH yang terikat pada gugus alifatik. Vibrasi tekuk C-O alkohol sekunder ditunjukkan pada serapan 1118,869; 1113,908; dan 1116,643 cm^{-1} yang dimiliki oleh ekstrak metanol, fraksi etil asetat dan air. Vibrasi O-H alkohol *stretching* ditunjukkan pada bilangan gelombang 1294,176; 1270,873; 1245,985; dan 1280,317 cm^{-1} . Spektrum inframerah yang

diperoleh dari ekstrak metanol, fraksi air, etil asetat dan *n*-heksana juga memiliki perbedaan serapan gelombang ditunjukkan pada Tabel 4.4.

Tabel 4.4 Interpretasi spektra FTIR ekstrak dan fraksi daun beluntas.

| Bilangan Gelombang (cm ⁻¹) | | | | Range Pustaka (cm ⁻¹) | Jenis Vibrasi |
|--|-----------|-----------|----------------------|-----------------------------------|---|
| EMB | FA | FEA | <i>F</i> <i>n</i> -H | | |
| 3417,610 | 3447,284 | 3432,873 | 3447,418 | 3550-3250 ^a | O-H <i>stretching</i> (alkohol) |
| 2928,297 | - | 2925,478 | 2923,688 | 3000-2800 ^a | C-H <i>stretching</i> (metilena) |
| 2857,753 | - | 2855,608 | 2851,911 | 2870-2840 ^a | C-H <i>stretching</i> (alkil) |
| 2360,618 | 2361,536 | 2361,547 | 2360,508 | 2400-211 ^b | C=O <i>stretching</i> |
| 2000-1700 | 2000-1700 | 2000-1700 | 2000-1700 | 2000-1650 ^b | Overtone aromatic |
| - | - | 1704,348 | 1716,905 | 1725-1700 ^b | C=O <i>stretching</i> (karbonil) |
| 1636,496 | - | 1608,129 | - | 1680-1600 ^c | C=C <i>stretching</i> (alkena) |
| - | 1521,743 | 1521,793 | - | 1600-1475 ^c | C=C <i>stretching</i> (aromatic) |
| - | - | 1457,514 | 1457,742 | 1480-1440 ^b | C-H pada CH ₂ <i>bending</i> |
| 1384,571 | - | 1384,597 | - | 1395-1365 ^b | C-H pada CH ₃ <i>bending</i> |
| 1294,176 | 1280,317 | 1270,873 | 1245,985 | 1350-1260 ^c | O-H <i>stretching</i> (fenol) |
| - | 1179,106 | 1160,912 | 1165,595 | 1300-1000 ^a | C-C <i>stretching</i> |
| 1118,869 | 1116,643 | 1113,908 | - | 1124-1000 ^a | C-O <i>stretching</i> (secondary alcohol) |
| - | - | 1050,048 | 1052,313 | 1055-1000 ^a | C-O <i>stretching</i> (alkohol) |
| 649,100 | 678,230 | - | 678,752 | 1000-650 ^a | C-H <i>out of plane bending</i> |

Keterangan: *a* adalah Shiner, dkk., 2000; *b* adalah Socrates, 1994; dan *c* adalah Coates, 2000. EMB adalah Ekstrak Metanol Beluntas; FA adalah Fraksi Air; FEA adalah Fraksi Etil Asetat dan *F**n*-H adalah Fraksi *n*-Heksana.

Pada ekstrak metanol, fraksi etil asetat, dan *n*-heksana memiliki daerah serapan pada 2928,297; 2925,478; dan 2923,688 cm⁻¹ menunjukkan adanya vibrasi C-H alifatik *stretching* yang menunjukkan adanya gugus metilena, diperkuat oleh serapan pada daerah 2857,753; 2855,608 dan 2851,911 cm⁻¹ diduga merupakan gugus alkil. Pada bilangan gelombang 1704,348 dan 1716,905 cm⁻¹ yang dimiliki

oleh fraksi etil asetat dan n-heksana menunjukkan adanya C-O *stretching*, diduga memiliki senyawa karbonil. Gugus khas geminal dimetil muncul pada daerah serapan 1457,514; 1457,742; 1384,571 dan 1384,597 cm^{-1} , didukung oleh serapan pada bilangan gelombang 649,100; 678,752 dan 678,230 cm^{-1} karena adanya C-H *out of plane bending*. Adanya C-O pada gugus alkohol dengan bilangan gelombang 1050,048 dan 1052,313 cm^{-1} . Serapan pada bilangan gelombang 1636,496; 1608,129; 1521,793 dan 1521,743 cm^{-1} menunjukkan adanya ikatan C=C aromatis yang diperkuat dengan serapan lemah (*overtone*) pada daerah 2000-1700 cm^{-1} . Gugus fungsi penting lainnya yaitu gugus ester yang ditunjukkan pada bilangan gelombang 1160,912; 1165,595 dan 1179,106 cm^{-1} . Pada daerah 2360,618; 2361,536; 2361,547 dan 2360,508 cm^{-1} diduga serapan C=O yang mengindikasikan adanya CO₂, hal tersebut terjadi karena waktu pembuatan *pellet* dilakukan diudara terbuka.

Berdasarkan uji fitokimia positif mengandung senyawa steroid, triterpenoid, flavonoid, tanin, saponin dan alkaloid. Dugaan ini diperkuat oleh literatur menurut Fasya, dkk. (2020) pada isolasi steroid dari *Hydrilla verticillate* dimana terdapat gugus geminal dimetil pada bilangan gelombang 1460 cm^{-1} dan 1383,5 cm^{-1} . Serapan gugus geminal dimetil ini adalah serapan khas dari senyawa steroid dan triterpenoid. Serapan khas untuk senyawa triterpenoid ditunjukkan dengan adanya gugus fungsi C-H alkana pada 2927,94 dan 2864,29 cm^{-1} dan juga gugus C=C non konjugasi ditunjukkan pada 1656 cm^{-1} . Pada penelitian Kopon, dkk. (2020) tentang skrining fitokimia pada daun alpukat, dimana hasilnya positif flavonoid, tanin, saponin, dan triterpenoid. Pada hasil FTIR ditunjukkan serapan khas flavonoid dihasilkan pada bilangan gelombang 2951,09 dan 2829,57 cm^{-1} yang menunjukkan

adanya vibrasi C-H *stretching*, terdapat serapan pada 1654 cm^{-1} menunjukkan adanya vibrasi C=C aromatik dan juga $1109,07\text{ cm}^{-1}$ yang menunjukkan adanya C-O alkohol. Serapan khas saponin ditunjukkan dengan adanya puncak pada bilangan gelombang $3444,87$ dan $3313,85\text{ cm}^{-1}$ yang menunjukkan gugus O-H dan $2926,01\text{ cm}^{-1}$ merupakan gugus C-H alifatik, $1236,26\text{ cm}^{-1}$ dan pada daerah 1384 cm^{-1} yang menunjukkan gugus *bending of methyl* (alkana). Serapan khas tanin ditunjukkan dengan adanya serapan C-O alkohol pada daerah $1059,40\text{ cm}^{-1}$, serapan karbonil di daerah 1700 cm^{-1} , serta terdapat pita serapan agak melebar di bilangan gelombang $1625,8\text{ cm}^{-1}$ dimungkinkan merupakan pita gabungan dari uluran C=O dan serapan ikatan rangkap C=C aromatik (Hayati, dkk. 2010). Dapat disimpulkan bahwa Spektrum inframerah yang diperoleh dari ekstrak dan fraksi daun beluntas memiliki perbedaan serapan gelombang yang diperoleh. Hal tersebut dikarenakan senyawa metabolit sekunder yang terkandung didalamnya memiliki perbedaan gugus fungsi.

4.10 Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi cakram. Bakteri akan menghambat pertumbuhan dengan membentuk zona bening disekitar kertas cakram. Metode ini dipilih karena praktis dan mudah dilakukan. Pada metode ini juga menggunakan kertas cakram (*paper disk*) dengan diameter 6 mm yang berfungsi sebagai tempat penghambat pertumbuhan zat antibakteri. Kertas cakram direndam dalam ekstrak maupun fraksi selama 30 menit berfungsi untuk menyerap senyawa aktif secara maksimal sehingga dapat menunjukkan adanya zona bening saat uji aktivitas antibakteri. Kemudian diletakkan pada lempeng agar yang sebelumnya sudah terdapat inokulum bakteri uji pada cawan petri. Setelah itu

diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C pada inkubator fungsinya untuk mengoptimalkan suhu dan kelembapan agar bakteri dapat berkembang biak dengan baik.

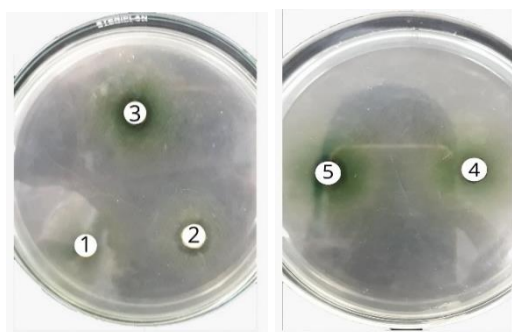
Proses inkubasi akan menghasilkan zona hambat bakteri dari ekstrak dan fraksi yang akan dibandingkan dengan kertas cakram yang telah direndam oleh kontrol positif maupun negatif. Kontrol positif berfungsi untuk membandingkan aktivitas antibakteri yang dihasilkan dari ekstrak maupun fraksi pada daun beluntas dengan zat antibiotik obat yang sudah ada. Dalam penelitian ini menggunakan kontrol positif berupa *ciprofloxacin* dan kontrol negatif berupa DMSO. Zona hambat yang dihasilkan jika semakin besar zona hambat yang diperoleh maka semakin efektif zat tersebut sebagai antibakteri (Rahmi dan Putri., 2020).

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan variasi konsentrasi yaitu 5, 10, 15, 20 dan 25%. Variasi konsentrasi tersebut berfungsi untuk mengetahui pengaruh dari pemberian ekstrak dan fraksi terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi daun beluntas dirangkum pada Tabel 4.5.

Tabel 4.5 Hasil Uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

| Konsentrasi (%) | Rata-rata Zona Hambat (mm) | | | |
|----------------------------------|----------------------------|------------|--------------------|------------------|
| | Ekstrak Metanol | Fraksi Air | Fraksi Etil Asetat | Fraksi n-Heksana |
| 5 | 1,6 | 2,9 | 3,9 | - |
| 10 | 3,3 | 3,6 | 4,8 | - |
| 15 | 5,0 | 4,6 | 5,5 | - |
| 20 | 5,3 | 5,5 | 5,8 | - |
| 25 | 6,1 | 6,3 | 6,6 | - |
| Kontrol positif (ciprofloxiacin) | | 18,36 | | |
| Kontrol negatif (DMSO) | | 0 | | |

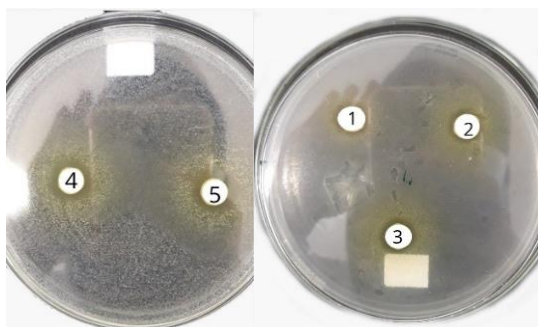
Berdasarkan Tabel 4.5 dapat diketahui bahwa fraksi *n*-heksana tidak memiliki aktivitas antibakteri. Hal tersebut dikarenakan senyawa aktif yang terkandung pada fraksi *n*-heksana tidak menunjukkan zona bening, yang dimungkinkan konsentrasi senyawa aktif kurang tinggi sehingga senyawa aktif yang terkandung didalamnya kurang bekerja secara maksimal. Sedangkan pada fraksi etil asetat diperoleh aktivitas antibakteri paling tinggi. Ekstrak metanol memiliki aktivitas antibakteri lebih kecil dari pada fraksi air. Hal itu dikarenakan senyawa aktif yang terkandung pada ekstrak metanol masih banyak, serta belum dilakukan pemisahan golongan senyawa aktifnya (L.6.1). Zona hambat yang dihasilkan pada ekstrak metanol daun beluntas terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dapat dilihat pada Gambar 4.16.



Gambar 4.16 Zona hambat ekstrak metanol daun beluntas

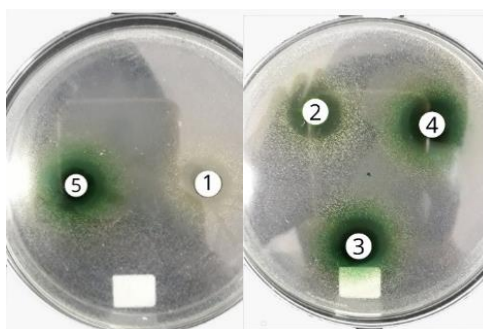
Berdasarkan Gambar 4.16 diketahui bahwa ekstrak metanol daun beluntas memiliki zona hambat pada variasi konsentrasi yang digunakan yaitu berkisar dari 1,6-6,1 mm. Zona hambat tertinggi yang dimiliki ekstrak tersebut bernilai 6,1 mm, sehingga dapat disimpulkan bahwa aktivitas antibakteri pada ekstrak tersebut termasuk dalam kategori sedang (5-10 mm). Sedangkan pada fraksi air daun beluntas menunjukkan adanya zona bening yang terbentuk sebesar 2,9 hingga 6,3 mm. Dapat diketahui dari hasil zona hambat tersebut, semakin besar konsentrasi

yang diberikan maka nilai zona hambat yang diperoleh semakin meningkat. Pada fraksi air zona hambat tertinggi sebesar 6,3 mm, yang dapat digolongkan termasuk dalam kategori sedang. Hasil uji antibakteri fraksi air dapat dilihat pada Gambar 4.17.



Gambar 4.17 Zona hambat air daun beluntas

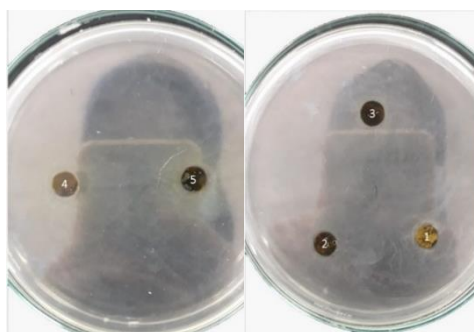
Fraksi etil asetat daun beluntas memiliki nilai zona hambat yang paling tinggi. Hal tersebut dimungkinkan senyawa aktif yang terkandung didalam fraksi tersebut memiliki aktivitas antibakteri yang besar, sehingga mempengaruhi hasil zona hambat yang dihasilkan. Zona hambat yang dihasilkan dari fraksi etil asetat dapat dilihat pada Gambar 4.18.



Gambar 4.18 Zona hambat fraksi etil asetat daun beluntas

Zona hambat yang dihasilkan dari fraksi etil asetat mengalami peningkatan dari konsentrasi 5 hingga 25%. Hal tersebut dapat dilihat pada Gambar 4.4 zona hambat

yang diperoleh berkisar dari 3,9 sampai 6,6 mm. Pada rentang zona hambat tersebut dapat dikategorikan dalam golongan sedang (5-10 mm). Begitu juga dengan fraksi *n*-heksana daun beluntas yang telah ditunjukkan pada Gambar 4.5 menunjukkan bahwa tidak terdapat zona bening yang bersifat antibakteri. Hal tersebut diduga senyawa aktif yang berpotensi sebagai antibakteri pada uji kali ini tidak bisa menembus dinding sel bakterinya, selain itu senyawa aktif yang berperan dalam aktivitas antibakteri cenderung terdistribusi ke dalam pelarut polar maupun semi polar. Zona hambat fraksi *n*-heksana dapat dilihat pada Gambar 4.19.



Gambar 4.19 Zona hambat pada fraksi *n*-heksana daun beluntas

Kontrol positif yang digunakan dalam penelitian ini adalah ciprofloxacin. Kontrol positif digunakan sebagai tolak acuan pada pentuan keaktifan ekstrak sebagai antibakteri. Pemilihan *ciprofloxacin* sebagai kontrol positif karena merupakan antibiotik yang memiliki spektrum luas, dan termasuk dalam golongan florokuinol yang paling umum digunakan dalam mekanisme kerja penghambat pertumbuhan sel bakteri (Faidiban, dkk., 2020) serta mempunyai aktivitas bakteristatik pada konsentrasi rendah dan pada konsentrasi tinggi bersifat bakterisida (Rosidah, dkk., 2014). Hasil pengujian menunjukkan bahwa rata-rata diameter zona hambat yang dihasilkan ialah sebesar 18,36 mm. Nilai zona hambat tersebut tergolong dalam kategori kuat, Jika dibandingkan dengan zona hambat

pada ekstrak dan fraksi daun beluntas serta kontrol negatif. Maka dapat dilihat hasil zona hambat pada kontrol positif dan negatif pada Gambar 4.20.



Gambar 4.20 Zona hambat larutan kontrol daun beluntas

Kontrol negatif berupa pelarut DMSO, pada uji aktivitas antibakteri tidak memberikan zona hambat terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Hal tersebut dikarenakan DMSO tidak mempengaruhi aktivitas antibakteri pada sampel. Sehingga diperoleh hasil uji yang murni dari hasil ekstrak dan fraksi yang digunakan. DMSO adalah salah satu pelarut yang dapat melarutkan hampir semua senyawa baik polar maupun non polar, serta senyawa yang memiliki toksisitas rendah, memiliki efek antiinflamasi, dan analgetik (Rahmi, dkk., 2020). Dari hasil pengujian pada Gambar 4.20 menunjukkan bahwa kontrol negatif berupa DMSO yang digunakan tidak memberikan pengaruh zona hambat terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

Kekuatan senyawa antibakteri dari ekstrak dan fraksi daun beluntas secara berturut-turut ialah fraksi etil asetat (sedang) > fraksi air (sedang) > ekstrak metanol (sedang) > fraksi *n*-heksana (lemah). Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa aktivitas antibakteri fraksi yang bersifat semi polar memiliki aktivitas

antibakteri paling tinggi disusul pelarut polar kemudian non polar. Hal tersebut dikarenakan bakteri *Staphylococcus aureus* memiliki dinding sel yang kandungan peptidoglikannya sebesar 90%. Peptidoglikan memiliki sifat polar sehingga mudah ditembus oleh senyawa antibakteri pada daun beluntas yang cenderung bersifat polar. Sehingga sel bakteri *Staphylococcus aureus* cenderung mudah diganggu oleh pelarut yang bersifat polar dimana pelarut tersebut mudah masuk kedalam dinding sel dan merusak lapisan peptidoglikan yang bersifat polar dari pada lapisan lipid yang bersifat nonpolar (Pangestuti, 2017).

Pada KLTA juga menunjukkan perbedaan senyawa yang terkandung pada setiap ekstrak dan fraksi daun beluntas, hal tersebut ditunjukkan dengan hasil noda dugaan senyawa flavonoid, saponin, dan tanin yang hanya terkandung pada ekstrak metanol dan fraksi etil asetat serta air, sedangkan pada fraksi *n*-heksana hanya terdapat noda yang menunjukkan dugaan senyawa steroid dan terpenoid saja. Hasil tersebut didukung dengan indentifikasi menggunakan spektroskopi uv-vis, dimana pada ekstrak metanol, fraksi etil dan air memiliki spektra yang hampir sama serta dugaan panjang gelombang maksimum yang diperoleh ialah 299-329 nm menunjukkan adanya senyawa flavonoid dan pada saponin ditunjukkan dengan panjang gelombang maksimum di sekitaran 211 dan 213 nm, sedangkan pada fraksi *n*-heksana hanya terdapat senyawa steroid, dan terpenoid yang ditunjukkan dengan Panjang gelombang maksimum disekitar daerah 203-245 nm. Hasil indentifikasi FTIR pada ekstrak metanol, fraksi etil dan air terdapat spektrum panjang gelombang 1608,1; 1521,7; 1384,5 dan 1113,9 cm^{-1} yang menunjukkan adanya gugus C=C, CH₃, dan C-O, sedangkan pada fraksi *n*-heksana tidak muncul serapan tersebut.

Berdasarkan hasil uji aktivitas antibakteri diperoleh nilai statistika (L.7.2) untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan yang signifikan antara variasi pelarut dan konsentrasi zona hambat ekstrak dan fraksi daun beluntas menggunakan varian *Two Way Anova*. Diketahui bahwa nilai f variasi jenis pelarut diperoleh nilai $f_{hitung} > f_{tabel}$ ($167.138 > 3.12$) dan uji probabilitas diperoleh nilai sig (0,000) lebih kecil dari nilai α (0,05), sedangkan pengaruh variasi konsentrasi menghasilkan nilai $f_{hitung} > f_{tabel}$ ($24.835 > 2.49$) dan diperoleh hasil uji propabilitas dimana nilai sig (0,000) lebih kecil dari nilai α (0,05). Berdasarkan nilai tersebut maka dapat disimpulkan bahwa variasi pelarut dan konsentrasi zona hambat memiliki pengaruh terhadap uji aktivitas antibakteri. Hasil nilai tersebut dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil (BNt) ditunjukkan pada Tabel 4.6.

Tabel 4.6 Hasil uji beda nyata terkecil (BNt) variasi pelarut terhadap zona hambat

| Variasi Pelarut | Notasi |
|------------------------|---------------|
| <i>n</i> -Heksana | a |
| Metanol | b |
| Air | b |
| Etil Asetat | c |

Berdasarkan Tabel 4.6 diperoleh notasi huruf yang sama menunjukkan tidak ada beda nyata antara rata-rata zona hambat bakteri terhadap variasi pelarut, sedangkan notasi huruf yang berbeda menunjukkan adanya beda nyata pada zona hambat terhadap variasi pelarut. Sehingga dapat diketahui bahwa pada bakteri *Staphylococcus aureus* terhadap pelarut metanol dan etil asetat tidak memberikan perbedaan nyata terhadap zona hambat bakteri, namun keduanya beda nyata pada pelarut *n*-heksana dan air. Adapun hasil uji beda nyata terkecil (BNt) variasi

konsentrasi terhadap zona hambat bakteri *Staphylococcus aureus* ditunjukkan pada Tabel 4.7.

Tabel 4.7 Hasil uji beda nyata terkecil (BNt) variasi konsentrasi terhadap zona hambat

| Konsentrasi (%) | Notasi |
|-----------------|--------|
| 5 | a |
| 10 | ab |
| 15 | bc |
| 20 | cd |
| 25 | d |

Hasil uji BNt pada Tabel 4.7 menunjukkan notasi huruf yang tidak beda nyata pada konsentrasi 10, 15 dan 20% terhadap zona hambat yang dihasilkan. Sedangkan pada konsentrasi 5 dan 25% menghasilkan notasi huruf yang berbeda nyata terhadap zona hambat yang diperoleh. Sehingga dapat disimpulkan bahwa pemberian masing-masing konsentrasi ekstrak/fraksi daun beluntas memberikan pengaruh tidak beda nyata dan beda nyata pada zona hambat yang dihasilkan.

4.11 Pemanfaatan Daun Beluntas (*Pluchea indica* L.) dalam Perspektif Islam

Allah Swt. menciptakan alam semesta beserta isinya yang mengandung banyak manfaat dan juga pelajaran yang bisa diambil. al-Qur'an juga telah memberitahu kepada umat manusia mengenai fakta-fakta ilmiah yang terjadi di alam semesta ini yang telah ditemukan. Adanya penemuan baru muncul akibat adanya suatu masalah yang harus dibuktikan dengan adanya suatu penelitian dan didukung dengan adanya pembuktian. Dalam al-Qur'an telah dijelaskan mengenai kenikmatan-kenikmatan yang telah diberikan di dunia salah satunya berupa

tanaman-tanaman dengan aneka macam dan manfaatnya. Firman Allah Swt. dalam surah Thaaha ayat 53.

الَّذِي جَعَلَ لَكُمُ الْأَرْضَ مَهْدًا وَسَلَكَ لَكُمْ فِيهَا سُبُلًا وَأَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ أَزْوَاجًا
مِّنْ نَّبَاتٍ شَتَّىٰ

Artinya: “Yang telah menjadikan bumi sebagai hamparan bagimu, dan menjadikan jalan-jalan di atasnya bagimu, dan yang menurunkan air hujan dari langit. Kemudian Kami tumbuhkan dengannya berjenis-jenis aneka macam tumbuh-tumbuhan.”

Ayat di atas menunjukkan kekuasaan-Nya bahwa dialah yang menurunkan hujan dari langit dan menumbuhkan bermacam-macam tumbuhan yang baik dan bermanfaat untuk kehidupan manusia dan makhluk hidup lainnya di muka bumi ini melalui perantara air yang diturunkan-Nya dari langit (hujan) (Shihab, 2002). Setiap jenis tumbuhan memiliki kandungan senyawa metabolit sekunder yang berbeda-beda. Sehingga manfaat yang dimilikinya berbeda pula, salah satunya dimanfaatkan sebagai obat tradisional. Hal tersebut dapat kita ambil pelajaran serta memikirkan tentang kekuasaan Allah Swt. yang merupakan sebagian bentuk hidayah yang diberikan oleh-Nya kepada manusia dan makhluk lain ciptaan-Nya. Pelajaran yang diperoleh termasuk tanda-tanda sangat besar yang Allah Swt. tunjukkan untuk umat-Nya agar mampu memanfaatkan berbagai macam tumbuhan yang terbentang luas di bumi ini dengan ilmu yang mereka miliki (Ad-Dimasyqi, 2001).

Daun beluntas telah dibuktikan dalam penelitian ini mengandung senyawa aktif yang mampu dimanfaatkan sebagai antibakteri. Berdasarkan hasil penelitian, diketahui bahwa ekstrak metanol, fraksi etil asetat, dan fraksi air daun beluntas

mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Antibakteri merupakan zat yang dapat mengganggu pertumbuhan atau bahkan mematikan bakteri dengan cara mengganggu proses metabolismenya. Sehingga dapat disimpulkan bahwa daun beluntas dapat dimanfaatkan sebagai obat antibakteri. Hal ini sesuai dengan firman Allah Swt. QS. Asy Syu'ara ayat 80.

وَإِذَا مَرَضْتُ فَهُوَ يَشْفِينِ

Artinya: “Dan apabila aku sakit, Dialah yang menyembuhkan aku”

Firman Allah Swt. tersebut menjelaskan bahwa salah satu upaya-Nya menyembuhkan penyakit yang diderita oleh makhluk-Nya ialah dengan menyediakan obat. Sehingga manusia diharapkan berupaya melakukan yang terbaik untuk menemukan obat niscaya akan diberikan kesembuhan oleh Allah Swt. Obat yang dimaksud salah satunya berasal dari tumbuhan, seperti daun. Dari hasil penelitian ini membuktikan bahwa daun beluntas memiliki golongan senyawa aktif berupa steroid, troterpenoid, flavonoid, saponin, dan tanin pada fraksi etil asetat yang merupakan fraksi dengan aktivitas antibakteri tertinggi. Golongan senyawa tersebut diduga berpotensi sebagai obat antibakteri, salah satunya pada bakteri *staphylococcus aureus*. Sehingga dapat disimpulkan bahwa daun beluntas tidak hanya dimanfaatkan sebagai lalapan maupun jamu di lingkungan masyarakat, namun memiliki manfaat yang luar biasa. Hal ini menunjukkan adanya kebesaran Allah Swt. yang terdapat dalam ayat-ayat al-Qur'an bahwa segala sesuatu yang diciptakan oleh-Nya di muka bumi ini tidak ada yang sia-sia.

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

- a. Fraksi etil asetat daun beluntas (*Pluchea indica* L.) memiliki aktivitas antibakteri tertinggi terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dibandingkan dengan fraksi *n*-heksana, air dan ekstrak methanol. Hasil zona hambat tertinggi terhadap pada fraksi etil asetat sebesar 6,6 mm, fraksi air zona hambat yang dihasilkan 6,3 mm, dan ekstrak methanol memiliki zona hambat 6,1 mm. Sedangkan fraksi *n*-heksana tidak memberikan zona hambat.
- b. Hasil fitokimia menunjukkan keberadaan golongan senyawa steroid, terpenoid, flavonoid, tanin, saponin dan alkaloid. Identifikasi gugus fungsi dengan spektroskopi UV-Vis menunjukkan terdapat ikatan rangkap C=C tidak terkonjugasi dan klorofil. Sedangkan identifikasi dengan FTIR menunjukkan terdapat gugus O-H, -CH₃, -CH₂, C=O dan C=C.

5.2 Saran

- a. Diperlukan peningkatan konsentrasi ekstrak dan fraksi daun beluntas (*Pluchea indica* L.), sehingga mampu memberikan zona hambat yang lebih besar (kuat).
- b. Diperlukan penelitian lebih lanjut sebagai upaya untuk mendapatkan senyawa aktif yang lebih spesifik, salah satunya menggunakan bantuan instrument GC-MS agar dapat mengetahui dengan pasti struktur senyawa aktif dalam daun beluntas (*Pluchea indica* L.) yang bersifat antibakteri.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, A., Nurjanah, dan Reyhan, M. 2017. Karakterisasi dan Identifikasi Senyawa Aktif Ekstrak Pigmen Telur Keong Mas. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 20(2): 286-295.
- Ad-Dimasyqi, Al-Imam Abd. F. Isma'il Ibn. Katsir. 2001. *Tafsir Ibnu Katsir*. terjemahan Bahrun Abu Bakar dkk juz 13. Bandung: Sinar Baru Algensindo.
- Agustina, S., Ruslan., dan Wiraningtyas, A. 2016. Skrining Fitokimia Tanaman Obat Di Kabupaten Bima. *Cakra Kimia*, 4(1): 71-76.
- Agustin, B. A., Puspawaty, N., Rukaman, R. M. 2018. Aktivitas Antibakteri Kombinasi Ekstrak Etanolik Daun Beluntas (*Pluchaea indica* Less.) dan Meniran (*Phyllanthus niruri* L.) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*. *BIOMEDIKA*, 11(2): 79-87.
- Agustrina, G. 2011. Potensi Propolis Lebah Madu *Apis Malifera app* sebagai Bahan Antibakteri. *Skripsi*. Bogor: Departemen Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor.
- Akiyama, H., Fuji, K., Yamasaki, O., Oono, T., dan Iwatsuki, K. 2001. Antibacterial Action of Several Tannis Agains *Staphylococcus aureus*. *Journal of Microbial Chemoterphy*, 48: 487-491.
- Alamsjah, M. A., Nurhayati, D., dan Tjahjaningsing, W. 2011. Pengaruh Ekstrak Alga Coklat (*Sargassum* sp.) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherchia coli* Secara *In Vitro*. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*, 3(1): 79-83.
- Alfiyaturohmah. 2013. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kasar Etanol, Kloroform dan *n*-Heksana Alga Coklat *Sargassum vulgare*. Asal Pantai Kapong Pamekasan Terhadap Bakteri *S. aureus* dan *E. Coli*. *Skripsi*. Tidak Diterbitkan. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim.
- Anam, C., Sirojudin, K., dan Firdausi, S. 2007. Analisis Gugus Fungsi Pada Sampel Uji, Bensin, dan Spirtus Menggunakan Metode Spektroskopi FTIR. *Bekala Fisika*, 10(1): 79-85.
- Annisa. 2017. Uji Aktivitas Antibakteri Senyawa Difeniltimah (IV) di-3-klorobenzoat dan Trifeniltimah (IV) 3-klorobenzoat terhadap Bakteri Gram

Negatif *Pseudomonas aeruginosa* dan Gram positif *Bacillus subtilis*. Tesis. Lampung: Program Sarjana Magister Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.

AOAC. 1984. *Official Method of Analysis*. Association of Official Analytical Chemists. Washington DC.

Ardiansyah, Nuraida, L., dan Nuri, A. 2003. Aktivitas Anti Mikroba Ekstrak Daun Beluntas (*Plucea indica L*) dan Stabilitas Aktivasnya Pada Berbagai Konsentrasi Garam dan Tingkat pH. *Jurnal teknologi dan industri pangan*, 18(2): 90-97.

Ardiyansah, I. 2019. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Ekstrak Cacing Laor (*Lysidice oele*) sebagai Antibakteri Pada *Salmonella typhi*. *Skripsi*. Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim.

Ashok, P. K., dan Upadhaya, K. 2012. Tannins Are Astringent. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 1(3): 45-50.

Astarina, N. W. G., Astuti, K. W., dan Warditiani, N. K. 2013. Skrining Fitokimia Ekstrak Metanol Rimpang Bangle (*Zingiber puppureum* Roxb.). *Jurnal Farmasi Udayana*, 2(4): 1-7.

Atmoko, D. P., Marliana, E., dan Erwin. 2018. Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Terpenoid Dari Daun *Macaranga beccariana* Merr. *Jurnal Kimia Mulawarman*, 16(1): 22-26.

Bhawani, S. A., Sulaiman, O., Hashim, R., dan Ibrahim, M. N. M. 2011. Thin layer chromatographic analysis of steroids., *Trop J Pharm Res*, 9(3): 301-313.

Boonruang, S., Prakobsri, K., Pouyfung, P., Srisook, E., Prasopthum, A., Rongnoparut, P., dan Saraput, S. 2017. Inhibition of human cytochromes P450 2A6 and 2A13 by flavonoids, acetylenic thiophenes and sesquiterpene lactones from *Plucea indica* and *Vernonia cinerea*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 32(1): 1136–114.

Braithwaite, A., dan Smith, F. J. 1999. *Chromatographic Methods*, Edisi Kelima. The Netherlands: Kluwer Academic Press.

Brock, T. D., dan Madigan, M. 1991. *Biology of Microorganisms*. Sixth ed. PrenticeHall International, Inc.

- Cai, L. 2014. *Thin Layer Chromatography*. South Carolina: Current Protocols Essential Laboratory Techniques.
- Cappucino, J. G., dan Natalie, S. 2007. *Microbiology: A Laboratory Manual*. San Fransisco: Pearson Education.
- Cavaliera, S. J., Harbeck, R. J., Ortez, J. H., dan Ivonne, R. 2005. *Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing*. USA: American Society for Microbiology.
- Chandra, Y. 2017. Uji Daya Hambat Beberapa Deodoran Terhadap Bakteri Penyebab Bau Ketiak *Pseudomonas aeruginosa* dan *Staphylococcus epidermidis* Dengan Metode Difusi Cakram. *Jurnal Analisis Farmasi*, 2(4): 278-282.
- Coates, J. 2000. *Interpretation of Infrared Spectra: A Practical Approach*. In: Meyers, R.A., Ed., *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley dan Sons Ltd., Chichester, 10881-10882.
- Dalimartha, S. 1999. *Atlas Tumbuhan Obat Jilit 1*. Jakarta: Trubus Agriwidya.
- Davis, W. W., dan Stout, T. R. 2009. Disc Plate Method of Microbiological Antibiotic Assay. *Applied and Enviromental Microbilogt*, 22(4): 666-670.
- Day, R. A., dan Underwood, A. L. 1999. *Analisis Kimia Kuantitatif edisi 6*. Jakarta: Erlangga.
- Depkes R. I. 1994. Keputusan Metri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 661/MENKES/SK/VII/199 tentang Persyaratan Obat Tradisiona. Jakarta: Departemen Kesahatan Republik Indonesia.
- Depkes R. I. 2005. Undang-Undang Republik Indonesia Nomor 23 Tahun 2005 tentang Kesehatan Fisioterapi Indonesia. Jakarta: Departemen Kesehatan.
- Dharma, M. A., Nocianitri, K. A., dan Yusasrini, N. L. A. 2020. Pengaruh Metode Pengeringan Simplisia Terhadap Kapasitas Antioksidan Wedang Uwuh. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Pangan*, 9(1): 88-95.
- Dima, L. R. H, Fatimawali, dan Lolo, W. A. 2016. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera* L.) Terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Pharmacon*, 5(2): 282-289.

- Dwidjoseputro, D. 1987. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Jakarta: Djambatan.
- Effendi, N. 2010. Standarisasi Simplisia Daun Hantap (*Sterculia coccinea* Jack) Asal Kabupaten Donggala Propinsi Sulawesi Tengah Sebagai Bahan Baku Sediaan Fitofarmaka. *Jurnal Sainsmat*, 1(1): 23-33.
- Elvina, R., dan Anggia, V. 2018. Uji Aktivitas Antibakteri Dari Daun Sirih (*Piper crocatum Ruiz. Pav.*) Terhadap Bakteri Penyebab Ulkus Diabetik. *Skripsi*. Fakultas Farmasi dan Sains Universitas Muhammadiyah Prof. Dr. Hamka.
- Ergina, S. N., dan Puspitasari, I. D. 2014. Uji Kualitatif Senyawa Metabolit Sekunder Pada Daun Palado (*Agave angustifolia*) yang Diekstraksi Dengan Pelarut Air dan Etanol. *Jurnal Akademik Kimia*, 3(3): 165-172.
- Ernawati, dan Sari, K. 2015. Kandungan Senyawa Kimia dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kulit Buah Alpukat (*Persea Americana* P. Mill) Terhadap Bakteri (*Vibrio alginolyticus*). *Jurnal Kajian Veteriner*, 3(2): 203-211.
- Faidiban, A. N., Posangi, J., Mowor, P. M., dan Bara, R. 2020. Uji Efek Antibakteri *Chromodoris annae* Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Medical Scope Journal*, 1(2): 67-70.
- Farhamzah, Herli, A., dan Mursal, I. L. P. 2021. Formulation and Antibacterial Activity Test of Foot Spray with Beluntas Leaf Ethanol Extract (*Pluchea Indica* L.). *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering*, 1071(1): 1-6.
- Farikhah, A. N., Mursiti, S., dan Prasetya, A. T. 2020. Uji Aktivitas Antibakteri Senyawa Triterpenoid dari Biji Karika (*Carica pubescans*). *Indo. Journal Chem*, 9(2): 112-116.
- Fasya, A. G., Purwantoro, B., Ulya, L. H., dan Ahmad, M. 2020. Aktivitas Antioksidan Isolat Steroid Hasil Kromatografi Lapis Tipis dari Fraksi *n*-Heksana *Hydrilla verticillata*. *Journal of Chemistry*, 1(1): 23-34.
- Febriyanti, R. 2021. Identifikasi Isolat Steroid dan Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi *n*-Heksana Hasil Ekstraksi Sonikasi Pada Mikroalga *Chlorella* sp. *Skripsi*. Program Studi Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Fessenden, R. J., dan Fessenden, J. S. 1986. *Kimia Organik Dasar Edisi Ketiga Jilid 2*, Terjemahan Oleh Aloysius Hadyana Pudjaatmaka. Erlangga: Jakarta.

- Fikayuniar, L., Abriyani, E., dan Februrohman, W. N. 2020. Secondary Metabolite Isolation Of Flavonoid From *Ceiba pentandra* L. *Pharma Xplore*, 5(1): 15–22.
- Firawati, dan Pratama, M. I. 2018. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Saponin Daun Bungkus (*Smilax rotundifolia*) Menggunakan Metode Spektrofotometri Ultraviolet. *Jurnal Farmasi*, 6(2): 115-121.
- Fitriansyah, M. I., dan Indradi, R. B. 2018. Review: Profil Fitokimia dan Aktivitas Farmakologi Baluntas (*Pluchea indica* L.). *Farmaka*, 16(2): 337-346.
- Gunawan, D., dan Mulyani, S. 2004. *Ilmu Obat Alam*. Bogor: Penebar Swadaya.
- Gibson, M., Kasman, dan Iqbal. 2017. Analisis Kualitas Klorofil Daun Jarak Kepyar (*Ricinus comunis* L.) Sebagai Bahan Pewarna Pada *Dye Sensitizer Cell* (DSSC). *Gravitasi*, 16(2): 31-40.
- Habib, F., Rind, R., Durani, N., Bhutto, A. L., Buriro, R. S., Tunio, A., Aijaz, N., Lakno, S. A., Bugti, A. G., dan Shoaib, M. 2015. Morphologi and Cultural Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolated from Different Animal Species. *Journal of Applied Environmental and Biological Science*, 5(2): 15-26.
- Handoko, D. S. P. 2006. Kinetika Hidrolisis Maltosa pada Variasi Suhu dan Jenis Asam sebagai Katalis. *SIGMA*, 9(1): 9-17.
- Harborne, J. B. 1987. Metode Fitokimia. Edisi ke-2. Padmawinata, K., dan Soediro, I., Penerjemah. Bandung (ID): Institut Teknologi Bandung. Terjemahan dari: Phytochemical methods. *International Federation of Clinical Chemistry* (IFCC). 2002. Committee on reference system for enzymes, *Chemical Clinic Laboratorium Medic*, 40(7): 725-733.
- Harborne, J. B. 2006. Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan (alih bahasa: Padmawinata, K., dan Soediro, I). Bandung: Penerbit ITB.
- Hariana, A. 2006. *Tumbuhan Obat & Khasiatnya seri 1*. Jakarta: Penebar Swadaya, hal.149-150.
- Hasanah, 2009. Pengaruh Ekstrak Daun Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Spermatogenesis Mencit (*Mus musculus*). *Skripsi*. Malang: Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim.

- Hasanela, N., Gaspersz, N., Silaban, R., dan Sohilait, M. R. 2020. Pengaruh Lama Penyimpanan Ekstrak Kasar Makroalga *Ulva Lactuca* terhadap Kestabilan Pigmen Fotosintesi. *Jurnal Inovasi Pendidikan dan Sains*, 1(3): 72-78.
- Hayati, E. K. 2007. *Dasar-dasar Analisis Spektroskopi*. Malang: UIN Malang, hal 35-41.
- Hayati, E. K., Fasyah, A. G., dan Sa'adah, L. 2010. *Fraksinasi dan Identifikasi Senyawa Tanin Pada Daun Belimbing wuluh (Averrhoa Bilimbi L.)*. *Jurnal Kimia*, 4(2): 193-200.
- Hayati, L. N., Tyasningsih, W., Praja, R. N., Chusniati, S., Yunita, M. Y., Wibawati, P. A. 2019. Isolasi dan Identifikasi *Staphylococcus aureus* Pada Susu Kambing Peternakan Etawa penderita Mastitis Subklinis di Kelurahan Kalipuro, Banyuwangi. *Jurnal Medik Veterier*, 2(2): 76-82.
- Hendayana, S. 2006. *Kimia Pemisahan Metode Kromatografi dan Elektroforesis Modern*. Bandung: PT. Remaja Rosdakarya.
- Hidayah, N., Mustikaningtyas, D., dan Bintari, S. H. 2017. Aktivitas Antibakteri Infusa Simplisia *Sargassum muticum* terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. *Life Science*, 6(2): 49-54.
- Hidayat, S. N. 2017. Formulasi dan Uji Aktivitas Antibakteri Gel Ekstrak Etanol Daun Beluntas (*Pluchea indica L.*) terhadap *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus* dan *Staphylococcus epidermis*. *Skripsi*. Purwokerto: Program Studi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Purwokerto.
- Ikalinus, R., Widyastuti, S. K., dan Setiasih, N. L. E. 2015. Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Kulit Batang Kelor (*Moringa oleifera*). *Indonesia Medicus Veterinus*, 4(1): 71-79.
- Illing, I., W. S., dan Erfiana. 2017. Uji Fitokimia Ekstrak Buah Dengan. *Jurnal Dinamika*, 08(1) : 66-84I.
- Imani, A. K.. 2008. *Tafsir Nurul Quran*. Jakarta: Al-Huda.
- Indarto, Windy, N., Bambang, S. A., dan Aulia, N. 2019. Aktivitas Antibakteri Daun Binahong Terhadap *Propionibacterium Acnes*. *BIOSFER*, 10(1): 67-78.

- Jannah, Miftahul. 2020. Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Etil Asetat dan Petroleum Eter Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol *Hydrilla verticillata* Terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Skripsi. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim.
- Jawetz, Mwnick, dan Adelberg. 1995. Mikologi Kedokteran. Dalam: *Mikrobiologi Kedokteran* (20 ed.). Jakarta: EGC.
- Jawetz, Melnick, dan Adelberg. 2005. *Medical Microbiology*. 23th Edition. USA: Mc Graw Hill Company.
- Jawetz, Melnick, dan Adelberg. 2008. *Medical Microbiology*. 24th Edition. USA: Mc Graw Hill Company.
- Khoiriyah, S., Hanapi, A., dan Fasya, A. G. 2014. Uji Fitokimia dan Aktivitas Antibakteri Fraksi Etil Asetat, Kloroform, dan Petroleum Eter Ekstrak Metanol Alga Coklat *Sargassum vulgare* dari Pantai Kapong Pamekasan Madura. *Alchemy*, 3(2): 133-144.
- Khopkar, S. M. 2003. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta: UI Press.
- Kiswandono, A. A. 2011. Skrining Senyawa Kimia dan Pengaruh Metode Maserasi dan Refluks pada Biji Kelor (*Moringa oleifera* Lamk) terhadap Rendemen Ekstrak yang Dihasilkan. *Jurnal Sains Natural Universitas Nusa Bangsa*, 1(2): 126–134.
- Koirewoa, Y. A., Fatimawali, dan Wiyono, W. 2012. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid dalam Daun Beluntas (*Pluchea indica* Less.). *Pharmacoin*, 1(1): 47-52.
- Kopon, A. M., Baunsele, A. B., dan Boelan, E. G. 2020. Skrining Senyawa Metabolit Sekunder Ekstrak Metanol Daun Alpukat (*Persea America* Mill.) Asal Pulau Timor. *Akta Kimindo*, 5(1): 43-52.
- Kristanti, A. N., Aminah, N. S., Tanjung, M., dan Kurniadi, B. 2008. *Buku Ajar Fitokimia*. Surabaya: UNAIR Press.
- Kulla, P. D. K. 2016. Uji Aktivitas Antibakteri dari Ekstrak Bawang Lanang (*Allium sativum* L.) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Skripsi. Yogyakarta: Program Studi Pendidikan Biologi Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Sanata Dharma.

- Kumar, P., dan Mina, U. 2017. *Life Science Fundamentals and Practice I sixth edition*. New Delhi, India: Pathfinder Publication.
- Kurniawati, I. Muftuch, dan Hariati, A. M. 2016. Penentuan Pelarut dan Lama Ekstraksi Terbaik Pada Teknik Maserasi *Gracilaria* sp. Serta Pengaruhnya Terhadap Kadar Air dan Rendemen. *Jurnal Ilmu Perikanan*, 7(2): 72-77.
- Lailiyah, M., Sukmana, P. H., dan Prasetyo, E. Y. 2019. Formulasi Deodoran Roll on Ekstrak Daun Waru (*Hibiscus Tiliaceus* L.) Pada Konsentrasi 3%, 5%, 8% Dan Uji Aktivitas Terhadap Bakteri *Staphylococcus Aureus*. *Cendekia journal of pharmacy*, 3(2): 106-114.
- Lestari, S., Fasya, A. G., Syarifah, U., dan Ningsih, R. 2015. Pemisahan Senyawa Aktif Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella* sp. Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Identifikasi Menggunakan FTIR. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim.
- Mabruroh, A. I. 2015. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Tanin dari Daun Rumpun Bambu (*Lophaterum gracile* Brongn) dan Identifikasinya. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim.
- Mabruroh, E. Q., Mursiti, S., dan Kusumo, E. 2019. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid dari Daun Murbei (*Morus alba* Linn). *Indo Journal Chem*, 8(1): 16-22.
- Madduluri, S., Rao, K. B., dan Sitaram, B. 2013. In Vitro Evaluation of Antibacterial Activity of Five Bacterial Patogens of Human. *International Journal of Pharmacu and Pharmaceutical Science*, 5(4): 679-684.
- Madigan, M., Martinko, J. M., Stahl, D. A., Bender, K. S., dan Buckley, D. H. 2012. *Brock Biology of Microorganism* Edisi 13. San Fransisco: Benjamin Cummings.
- Maharani, T., Sukandar, D., dan Hermanto, S. 2016. Karakterisasi Senyawa Hasil Isolasi dari Ekstrak Etil Asetat Daun Namnam (*Cynometra Cauliflora* L.) yang Memiliki Aktivitas Antibakteri. *Valensi*, 2(1): 55-62.
- Manu, R. R. S. 2013. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Beluntas (*Pluchea indica* L.) terhadap *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas aeruginosa*. *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Universitas Surabaya*, 2(1): 1-10.
- Markham, K. R. 1988. *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*. Bandung: ITB Press.

- Marliana, S. D., Suryanti, V., dan Suyono. 2005. Skrining Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Komponen Kimia Buah Labu Siam (*Sechium Edule Jacq.* Swartz.) dalam Ekstrak Etanol. *Biofarmasi*, 3(1): 26-31.
- Marsasi, B., Yuwono, dan Salni. 2019. Perbandingan antara Pemberian Fraksi Daun Beluntas (*Pluchea indica* Lees) dan Ketokonazol Secara Invitro Terhadap *Candida Albicans*. *Biomedical Journal of Indonesia*, 5(1): 20-29.
- Masfufah, N. L. 2016. Isolasi dan Uji Aktivitas Senyawa Alkaloid dari Tanaman Anting-Anting (*Acalypha indica* L.) pada Sel Kanker Payudara T47D. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim.
- Mashunah, E., Erwin, dan Sitorus, S. 2020. Isolasi Steroid dan Identifikasi dari Ekstrak n-Heksana Daun Afrika (*Vernonia amygdalina* Del.). *Jurnal Riset Kimia*, 6,(1): 18-22.
- Masrihanah, A. 2020. Uji aktivitas antioksidan ekstrak ultrasonik air, metanol, etanol, etil asetat dan petroleum eter daun katuk (*Sauropus androgynus* L. merr). *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim.
- Miftahurrahman. 2012. Ekstraksi, Uji Aktivitas Antibakteri dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Alga Merah *Eucheuma spinosum* dari Pesisir Laut Banyuwangi. *Skripsi*. Tidak diterbitkan. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim.
- Muharni, Fitriya, dan Farida, S. 2017. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Tanaman Obat Suku Musi di Kabupaten Musi Banyuasin, Sumatera Selatan Antibacterial Assay of Ethanolic Extract Musi Tribe Medicinal Plant. *Jurnal Kefarmasian Indonesia*, 7(2): 127–135.
- Muhibah, S. R. N. 2013. Uji Golongan Senyawa Aktif dan Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Alga Merah *Eucheuma Cattonii* dari Petani Lobuk Madura. *Skripsi*. Tidak Diterbitkan. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim.
- Muhridja, M., Bialangi, N., dan Musa, W. J. A. 2016. Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Aktif Repellet Nyamuk dari Ekstrak Rimpang Jeringau (*Acorus calamus*). *Jurnal Entropi*, 11(2): 176-184.

- Muhsinin, S., Parida, I., Rum, I. A., dan Kusnaidi. 2019. Isolasi Bakteri Endofit dari Daun Sirih (*Piper betle* L.) Sebagai Antibakteri Terhadap *Staphylococcus aureus*. *Journal of Pharmacopolium*, 2(3): 173-178.
- Muta'ali, R., dan Purwani, K. I. 2015. Pengaruh Ekstrak Daun Beluntas (*Pluchea indica*) terhadap Mortalitas dan Perkembangan Larva Spodoptera litura F. *JURNAL SAINS DAN SENI ITS*, 4(2): 55-58.
- Nasution, A. U. 2021. Identifikasi Hasil Isolasi Pigmen Klorofil dari Daun Siboga (*Leea indica* F.) Menggunakan Spektrofotometer Ultraviolet Visible (UV-Vis). *Skripsi*. Medan: Program Studi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Sumatera Utara.
- Ngajow, M., Abidjulu, J., dan Kamu, V. S. 2013. Pengaruh Antibakteri Ekstrak Kulit Batang Matoa (*Pometia pinnata*) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* Secara *in Vitro*. *Jurnal UNSRAT MIPA Online*, 2(2): 128-132.
- Nihlati, I. A., Rohman, A., dan Hertiani, T. 2008. Daya Antioksidan Ekstrak Etanol Rimpang Temu Kunci (*Boesenbergia pandurata*) Dengan Metode Penangkapan Radikal DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil). *Jurnal Farmasi UGM*, 1-8.
- Noviantari, N. P., Suhendra, L., dan Wartini, N. M. 2017. Pengaruh Ukuran Partikel Bubuk dan Konsentrasi Pelarut Aseton Terhadap Karakteristik Ekstrak Warna *Sargasum polycystum*. *Jurnal Rekayasa dan Manajemen Argoindustri*, 5(3): 102-112.
- Novitasari, A. E., dan Putri, D. Z. 2016. Isolasi dan Identifikasi Saponin pada Ekstrak Daun Mahkota Dewa dengan Ekstraksi Maserasi. *Jurnal Sains*, 6(12): 10-14.
- Nurahmanto, D., Tanjaya, E., Arizka, H. E., dan Hasanah, S. U. 2016. Perbandingan Aktivitas Antimikroba Ekstrak Etanol Daun Beluntas (*Pluchea indica* L.) Sediaan Gel dan Spray Antiseptik. *Prosiding Seminar Nasional*. Current Challenges in Drug Use and Development, hal: 63-72.
- Nuria, M. C., Faizatun, A., dan Sumantri. 2009. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Jarak Pagar (*Jatropha caracas* L.) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, dan *Salmonella typhi* ATCC 1408. *Mediagro*, 5(2): 26-30.
- Oktavia, G. A. E., Ibrahim, M., dan Lisdiana, L. 2013. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Biji Mahoni (*Swietenia mahagoni*) terhadap Penghambatan

- Pertumbuhan *Escherchia coli* dengan Metode Difusi Cakram. *Lenterabio*, 2(3): 239-243.
- Olagoke, O. V., Aborisade, A. B., dan Olasupo, A. D. 2017. Antibiotic Resistance Profile of Bacterial Isolates Cultured from Urine Sample of HIV Serepositive Pregnant Woment. *Microbiology Research Journal International*, 4(21): 1-10.
- Owu, N. M., Fatimawali, dan Jayanti, M. 2020. Uji Efektivitas Penghambatan Dari Ekstrak Daun Sirih (*Piper Betle* L.) Terhadap Bakteri *Streptococcus mutans*. *Jurnal Biomedik*, 12(3): 145-152.
- Paju, N., Yamlean, P., Kojong, N. 2013. Uji Efektivitas Salep Ekstrak Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten Steenis)) Pada Kelinci yang Terinfeksi Bakteri *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Ilmiah Farmasi*, 2(1): 51-61.
- Palczar, M. J., dan Chan, E. C.S. 1998. *Dasar-dasar Mikrobiologi Edisi ke-2*. Diterjemahkan oleh Hadioetomo, R. S. Jakarta: Universitas Indonesia.
- Pangestuti, I. E., Sumardianto, dan Amalia, U. 2017. Skrining Senyawa Fitokimia Rumpul Laut *Sargassum* sp dan Aktivitas Sebagai Antibakteri Terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherchia coli*. *Journal of Fisheries Science and Tecnology*, 12(2): 98-102.
- Parubak, A. S. 2013. Senyawa Flavonoid yang Bersifat Antibakteri dari Akway (*Drimys becariana*. Gibbs). *Chemistry Program*, 6(1): 34-37.
- Poedjiadi, A. 1994. *Dasar-dasar Biokimia*. Jakarta: UI Press.
- Putra. I. P. 2017. Aktivitas Inhibisi Fraksi Aktif Ekstrak Daun Beluntas (*Pluchea indica* Less.) terhadap Target Obat Antimalaria *Plasmodium falciparum* Malate Quinone Oxidoreductase (PfMQO). *Skripsi*. Jakarta: Jurusan Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UIN Syarif Hidayatullah.
- Pratiwi, D. A. N. 2014. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Pacar Kuku (*Lowsonia inermis* L.) dan Bioautografi terhadap *Bacillus substitulis* dan *Shigella sonnie*. *Skripsi*. Surakarta: Jurusan Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Payudo, A. N., Novian, O., Setyadi, dan Astaresti. 2015. Koefisien Transfer Massa Kurkumin dari Temulawak. *Jurnal Ilmiah Widya Teknik*, 14(1): 26-31.

- Pujowati, P. 2006. *Pengenalan Ragam Tanaman Lanskap Asteraceae (composite)*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Purwatresna, E. 2012. *Aktivitas Antidiabetes Ekstrak Air Dan Etanol Daun Sirsak Secara in Vitro Melalui Inhibisi Enzim A-Glukosidase. Skripsi*. Tidak Diterbitkan. Bogor: Departemen Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Alam Institut Pertanian Bogor.
- Puspaningtyas, D. E., dan Utami, P. 2013. *The Miracle of Herbs*. Jakarta Agromedia Pustaka.
- Putri, L. E. 2017. Penentuan Konsentrasi Senyawa Berwarna KMnO_4 Dengan Metoda Spektroskopi UV Visible. *Natural Science Journal*, 3(1): 391-398.
- Putri, W. S., Warditiani, N. K., dan Larasanti, L. P. F. 2013. Skrining Fitokimia Ekstrak Etil Asetat Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana L.*). *Jurnal Farmasi Udayana*, 2(4): 56-60.
- Rahayu, I. D., dan Hastuti, S. D. 2008. Stabilitas Saponin Sebagai Antibiotik Alami Hasil Isolasi Gel Daun Aloe Berbanding Miller pada Variasi Suhu dan Lama Simpan. *Jurnal Pharmasi*, 5(1): 60-68.
- Rahayu, T., Waluyo, J., dan Aisyah, I. N. 2012. Pengaruh Ekstrak Daun Beluntas (*Pluchea Indica L.*) Terhadap Demam Tifoid Pada Tikus Putih (*Rattus Norvegicus L.*) Jantan dan Pemanfaatannya Sebagai Buku Nonteks. *Artikel Ilmiah Mahasiswa*, 1(1): 1-4.
- Rachman, A., Wardatun, S., dan Weandarlina, I. Y. 2018. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Saponin Ekstrak Metanol Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis). *Jurnal Online Mahasiswa*, 1(1): 1-6.
- Rahmawati, F., Bintang, M., dan Artika, I. M. 2017. Antibacterial Activity and Phytochemical Analysis of *Geranium homeanum* Turez Leaves. *Current Biochemistry*, 4(3): 13-22.
- Rahmi, M., dan Putri, D. H. 2020. Aktivitas Antimikroba DMSO Sebagai Pelarut Ekstrak Alami. *Serambi Biologi*, 5(2): 56-58.
- Rasyidi, R. D. G. 2016. Penentuan Aktivitas Antioksidan Isolat RNV-1 Hasil Isolasi Dari Batang Tanaman Binahong (*Anredera cordifolia*). *Tesis*. Lampung: Program Pascasarjana Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Bandar Lampung.

- Rikamah, S. E., dan Elmira. 2017. Identifikasi Senyawa Saponin Ekstrak Pelepah Pisang Uli (*Musa Paradisa* L.). *Scientia*, 7(1): 56-60.
- Rita, W. S., Suteja, I. K. P., Asih, I. R. A., Swantara, I. M. D., dan Gunawan, I. W. G. 2015. Identifikasi dan Uji Aktivitas Senyawa Flavonoid dari Ekstrak Daun Trembesi (*Albizia saman* (Jacq.) Merr) Sebagai Antibakteri *Escherchia coli*. *Seminar Nasional Sains dan Teknologi*, 1(3): 1-8.
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Penerjemah: Kosasih Padmawinata. Edisi IV. Bandung: ITB Press.
- Roihanah, S., Sukoso, dan Andayani, S. 2012. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Teripang *Holothuria* sp. Terhadap Bakteri *Vibrio harveyi* Secara *In vitro*. *J. Exp. Life Sci*, 2(1): 1-5.
- Romadanu, R., Hanggita, S., dan Lestari, S. D. 2014. Pengujian Aktivitas Antioksidan Ekstrak Bunga Lotus (*Nelumbo nucifera*). *Fishtech*, 3(1): 1-7.
- Roni, A., Maesaroh, dan Marliani, L. 2018. Aktivitas Antibakteri Biji, Kulit Dan Daun Papaya (*Carica papaya* L.) Terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Ilmiah farmasi*, 6(1): 29-33.
- Rosidah, A. N., Lestari, P. E., dan Astuti, P. 2014. Daya Antibakteri Ekstrak Daun Kendali (*Hippobroma longiflora* [L] G. Don) terhadap Pertumbuhan *Streptococcus mutans*. *Artikel Ilmiah Hasil Penelitian Mahasiswa*. 2(1): 1-7.
- Rusdi, N. K., Hikmawanti, N. P. E., Maifitrianti, Ulfah, Y. S., dan Annisa, A. T. 2018. Aktivitas Afrodisiaka Fraksi dan Ekstrak Etanol 70% Daun Katuk (*Souropus androgynous* L. Merr) pada Tikus Putih Jantan. *Pharmaceutical Sciences and Research*, 5(3): 123-132.
- Sahriawati, S., dan Wahyuni. 2020. Validasi Metode dan Penetapan Kadar Kolesterol Ayam Broiler dengan Metode *Lieberman-Burchard*. *LUTJANUS*. p-ISSN: 0853 – 7658.
- Saifudin, A. 2014. *Senyawa Metabolit Sekunder*. Yogyakarta: Deepublish.
- Salle, A. J. 1961. *Fundamental Principle of Bacteriologi 5th edition*. New York: MC Graw Hill Book Company Inc.

- Salni, H. M., dan Mukti, R. W. 2011. Isolasi Senyawa Antibakteri Dari Daun Jengkol (*Pithecolobiumlobatum Benth*) dan Penentuan Nilai Khm-nya. *Jurnal Penelitian Sains*, 14(1): 38-41.
- Sapara, T. U., Waworuntu, O., dan Juliantri. 2016. Efektivitas Antibakteri Ekstrak Daun Pacar Air (*Impaties balsamina L.*) terhadap Pertumbuhan *Porphyromonas gingivalis*. *Pharmacon Jurnal Ilmiah Farmasi Unsrat*, 5(4): 10-17.
- Sari, Y. D., Djannah, S. N., Nurani, L. H. 2010. Uji Aktivitas Antibakteri Infusa Daun Sirsak (*Annona murica L.*) Secara in Vitro Terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 35218 serta Profil Kromatografi Lapis Tipis. *KESMAS*, 4(3): 144-239.
- Sastrohamodjojo. 2007. *Spektroskopi*. Yogyakarta: Liberty.
- Savitri, E. S. 2008. *Rahasia Tumbuhan Berkasiat Obat Perspektif Islam*. Malang: UIN-Malang Perss.
- Senduk, T. W., Montolalu, L. A. D., dan Dotulong, V. 2020. Rendemen Ekstrak Air Rebusan Daun Tua Mangrove *Sonneratia alba*. *Jurnal Perikanan dan Kelautan Tropis*, 11(1): 9-15.
- Shihab, M. Q. 2002. *Tafsir al-Misbah; Pesan, Kesan, dan Keserasian Alquran Vol. 5* Jakarta: Lentera Hati.
- Shofa, S. A. 2020. Skrining fitokimia dan Identifikasi Metabolit Sekunder Secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT) pada Nanopartikel Kitosan Ekstrak Ekstrak Bawang Putih (*Allium sativum* Liin), Jeringau (*Acorus calamus L.*), Temu Mangga (*Curcuma mangga Val.*), dan Kombinasinya. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim.
- Sholikhah, R. M. 2016. Identifikasi Senyawa Triterpenoid Dari Fraksi n-Heksana Ekstrak Rumput Laut Bambu (*Lophatherum gracile Brongn.*) Dengan Metode UPLC-MS. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim.
- Shriner, R. L., Hermann, C. K. F., Morrill, T. C., David, Y. C., dan Fuson, R. C. 2004. *The Systematic Identification of Organic Compounds 8th Edition*. New Jersey: John Wiley dan Sons.

- Siadi, I. K. 2012. Ekstrak Bungkil Biji Jarak Pagar (*Jatropha Curcas*) Sebagai Biopestisida yang Efektif dengan Penambahan Larutan NaCl. *Jurnal Mipa*, 35(1): 77-83.
- Sigee, D. C., Dean, A., Levado, E., dan Tobin, M. J. 2002. Fourier-Transform Infrared Spectroscopy of *Pediastrum duolex*. Characterization of a Micro-Population Isolated from A Eutrophic Lake. *European Journal Physical*, 37(3): 19-26.
- Simamere, E. S. 2014. Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Daun Gatal (*Laportes decumana* (Roxb.) Wedd). *Jurnal Pharmacy*, 11(1): 98-107.
- Simarmata, R. 2013. Isolasi dan Modifikasi Struktur Senyawa Metabolit Spongia *Xestospongia* sp. Perairan Teluk Kupang Nusa Tenggara Timur. *Skripsi*. Lampung: Jurusan Kimia Fakultas Ilmu Pengetahuan dan Matematika Universitas Lampung.
- Sjahid, L. R. 2008. Isolasi dan Identifikasi Flavonoid dari Daun Dewandaru (*Eugenia uniflora* L.). *Skripsi*. Surakarta: Jurusan Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Socrates, G. 1994. *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies Table and Charts, 3rd Edition*. New York: Mc Graw Hill.
- Sriwahyuni, I. 2010. Uji Fitokimia Ekstrak Tanaman Ating-ating (*Acalypha Indica* Linn) dengan Variasi Pelarut dan Uji Toksisitas Menggunakan *Brine shrimp* (*artemia salina* leach). *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim.
- Sulastry, T., dan Kurniawati, N. 2010 Isolasi Steroid dari Ekstrak Metanol Daun Beluntas (*Pluchea Indica* L.). *Jurnal Chemica*, 11(1): 52-56.
- Sulistyarini, I., Sari, D. A., dan Wicaksono, T. A. 2020. Skrining Fitokimia Senyawa Metabolit Sekunder Batang Buah Naga (*Hylocereus polyrhizus*). *Jurnal Ilmiah Cendekia Eksakta*, 5(1): 56-62.
- Supardi dan Sukamto. 1999. *Mikrobiologi Dalam Pengolahan dan Keamanan Produk Pangan*. Bandung: Penerbit Alumi.
- Suharto, M. A. P., Hosea, J. E., dan Dumanauw, J. M. 2012. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Saponin dari Ekstrak Metanol Batang Pisang Ambon (*Musa paradisiaca* var. *sapientum* L.). *Pharmacon UNSRAT*, 1(2): 3-10.

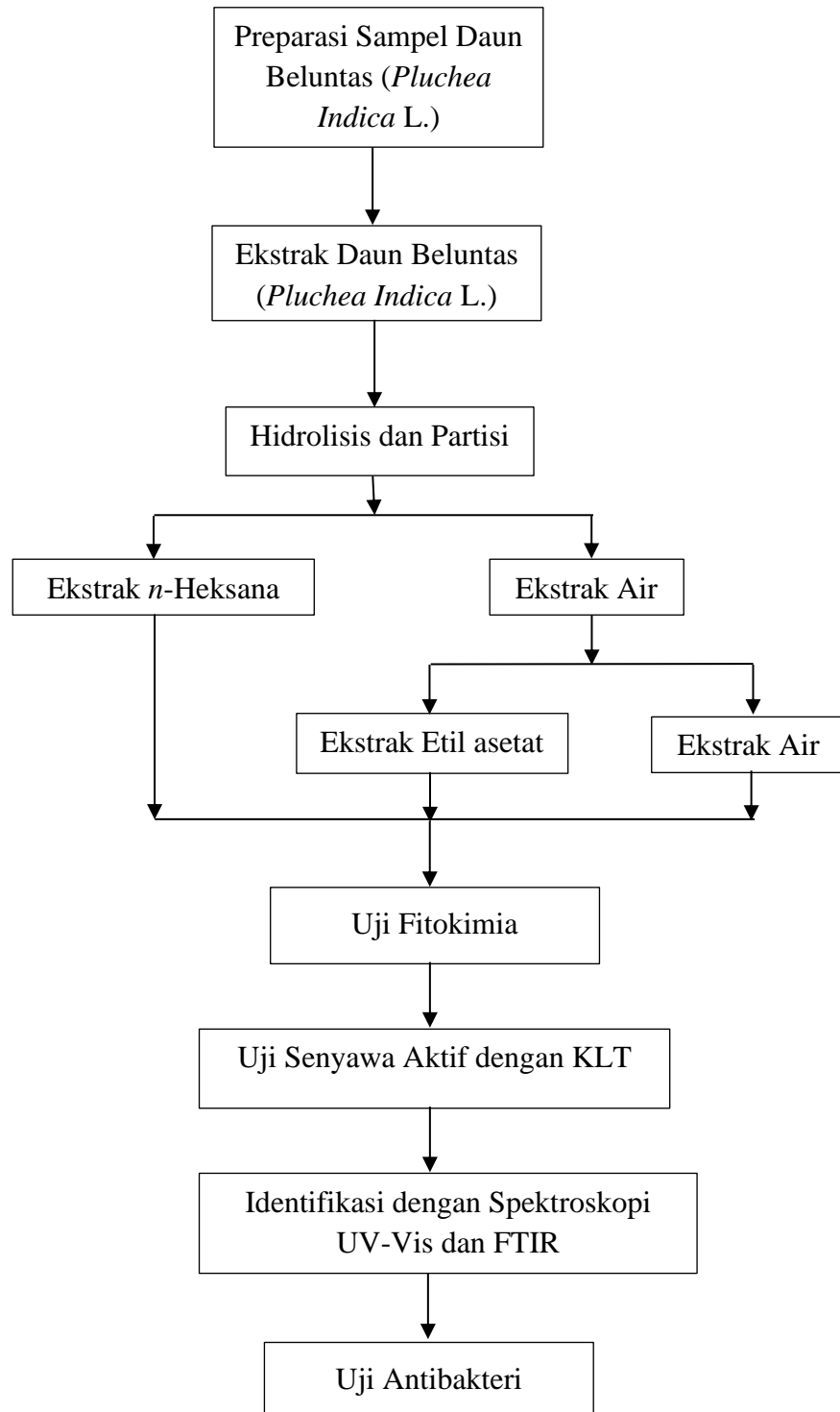
- Susetyarini, E. 2007. Pengaruh Dekok Daun Beluntas (*Pluchea indica Less.*) terhadap LD 50 (Toksitas Akut) Tikus Putih Jantan (*Ratus norwegicus*). *Laporan Penelitian*. Lemlit UMM, hal: 1-6.
- Sutomo., Buih, P. H. J., dan Arnida. 2020. Isolasi Senyawa Terpenoid dari Fraksi *n*-Heksana Daun Bilaran Tapah (*Argyria nervosa* (Burm F.) Asal Kalimantan Selatan. *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*, 7(2): 12-17.
- Tensiska, M., dan Yudiastuti, S. O. N. 2007. Pengaruh Jenis Pelarut Terhadap Antioksidan dan Ekstrak Kasar Isoflavon dari Ampas Tahu. *Jurnal Industri Teknologi Pertanian*, 1(3): 1-8.
- Tiwari, Prashant., Kumar, Bimlesh., Kaur, Mandeep., Kaur Gurpreet., dan Kaur Harleen. 2011, Phytochemical Screening And Extraction: A Review, *International Pharmaceutica Scientia*, 1(1): 98-106.
- Trisyanto. 2009. Studi Aktivitas Antibakteri dan Identifikasi Golongan Senyawa Ekstrak AKtif Antibakteri Buah Gambas (*Luffa acutangula Roxb*). *Skripsi*. Surakarta: Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sebelas Maret.
- Voigh, R. 1994. *Buku Pelajaran Teknoloi Farmasi Edisi V*. Yogyakarta: UGM Press.
- Volk, W. A., dan Wheeler, M. F. 1993. *Mikrobiologi Dasar*. Alih Bahasa: Markham. Jakarta: PT. Glora Aksara Pratama.
- Wahjuni, S., Puspawati, N. M., dan Arista, N. P. R. E. 2016. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Aktif Anti Jamur dari Daun Mimba (*Azadiractha indica A. Juss.*) Sebagai Pengendali Jamur *Fusarium* sp. Pada Tanaman Buah Naga (*Hylocereus* sp.). *Jurnal Kimia*, 10(2): 197-203.
- Widiyatni. 2010. Isolasi Penentuan Struktur Senyawa Serta Uji Aktivitas Biologi Dari Ekstrak Etanol Tandan Tanaman *Musa paradisiaca*. *Tesis*. Jakarta: Program Magister Ilmu Kimia Kekhususan Kimia Hayati Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Universitas Indonesia.
- Widyawati, P. S., Wijaya, H., Hardjosworo, P., dan Sajuthi, D. 2012. Aktivitas Antioksidan Berbagai Fraksi dan Ekstrak Metanolik Daun Beluntas (*Pluchea indica Less*). *Agritech*, 32(3): 249-257.
- Widowati, L., Dzulkarnain, dan Sa'roni. 1997. Tanaman Obat untuk Diabetes *Mellitus*. Pusat Penelitian dan Pengembangan Farmasi, Badan Penelitian

dan Pengembangan Kesehatan. Depkes RI. Jakarta: Cermin Dunia Kedokteran.

- Wikananda, I. D. A. R. N., Hendrayana, M. A., Pinatih, K. J. P. 2019. Efek Antibakteri Ekstrak Etanol Kulit Batang Tanaman Cempaka Kuning (*M. Champaca*. L) Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus Aureus*. *E-Jurnal Medika*, 8(5): 1-5.
- Wulandari, L. 2011. *Kromatografi Lapis Tipis*. Jember: PT. Taman Kampus Presindo.
- Wulandari, V., Husain, D. R., Sartini, dan Haedar, N. 2016. Pengujian Aktivitas Antibakteri Dari Ekstrak Etanol Daun Beluntas (*Pluchea indica* Less.) Terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*. *International journal of Scientific and Research Publication (IJSRP)*, 9(7): 1-9.
- Yulianti, R., Surjowardojo, P., dan Susilorini, T. E. 1995. Antibacterial Efficacy of Beluntas (*Pluchea indica* L.) Leaves Aqueous Extract Against *Staphylococcus aureus* and *Escherchia coli* which Cause Subclinical Mastitis in Dairy cow. *Japanese Journal of Allergology*, 44(8): 821–822.
- Yulianti, R. D. 2008. Penentuan Seng dalam Kerang Darah (*Schaparcha inaequalvis*) dengan Pengompleks *Alizarin Red* Secara Spektrofotometri Uv-Vis. *Skripsi*. Surabaya: Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Teknologi Sepuluh Nopember.
- Yusrin, dan Mukaromah, A. H. 2010. Proses Hidrolisis Onggok dengan Variasi Asam pada Pembuatan Ethanol. *Prosiding Seminar Nasional Unmus*. ISBN: 978.979.704.883.9. hal: 20-25.

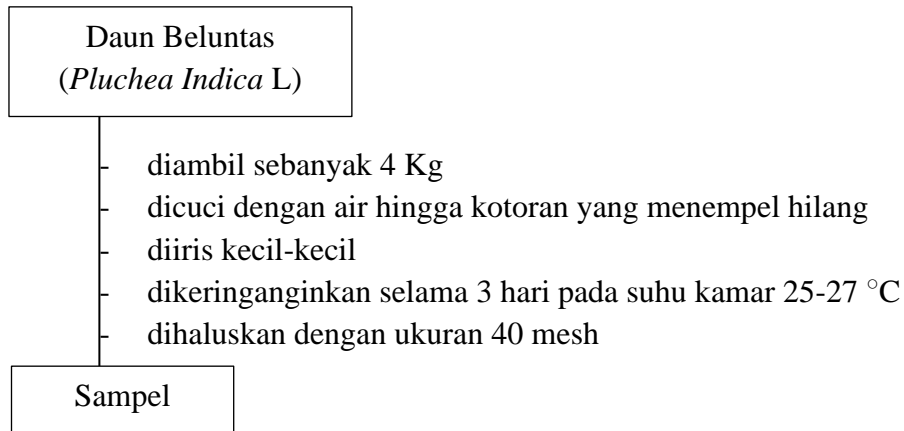
LAMPIRAN

Lampiran 1. Rancangan Penelitian

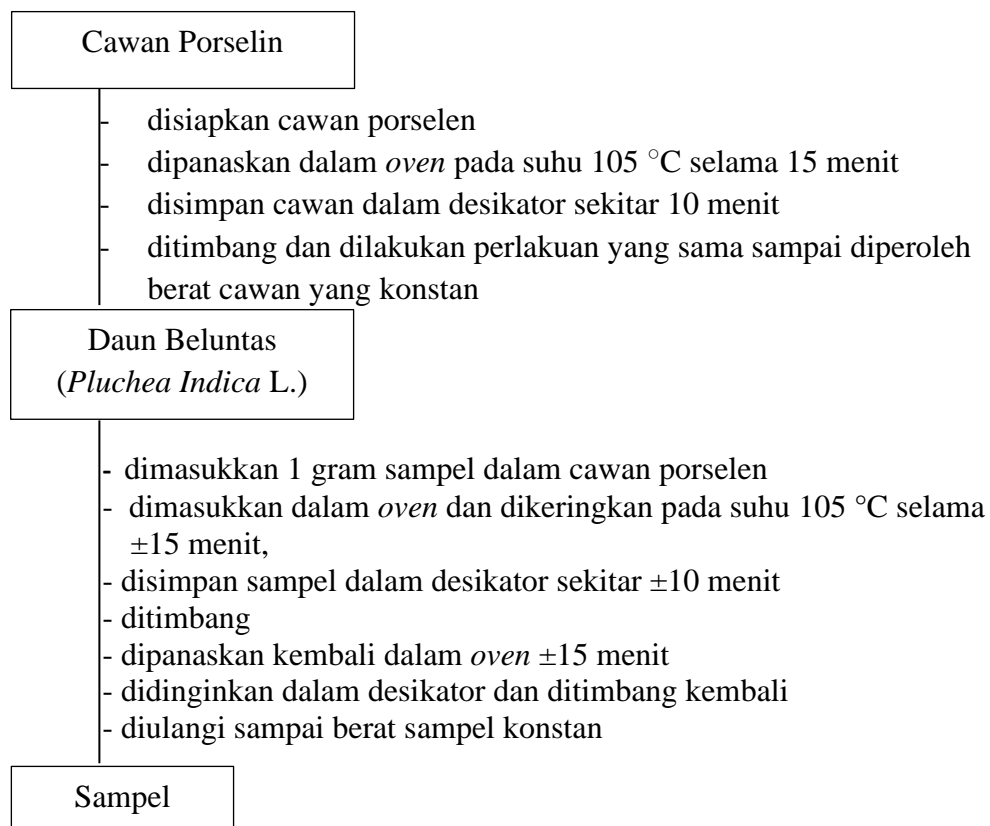


Lampiran 2. Skema Kerja

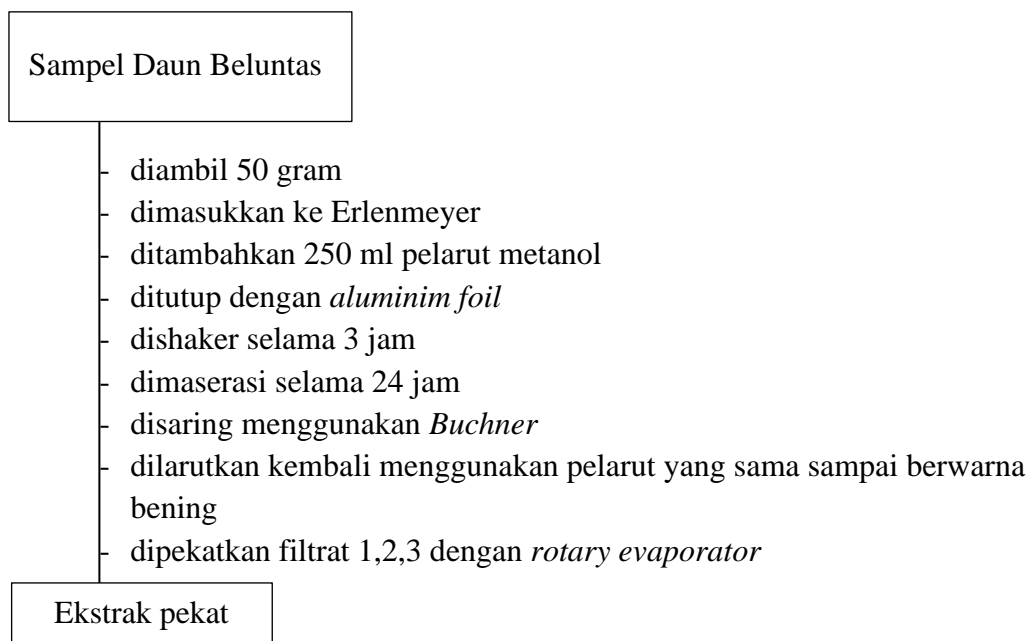
L.2.1 Preparasi Sampel



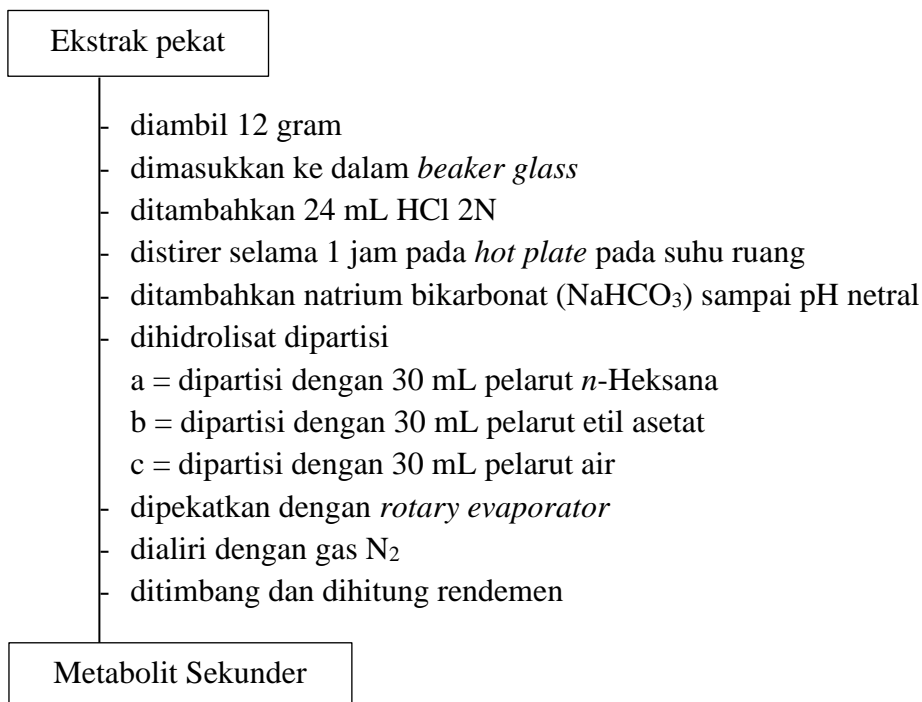
L.2.2 Penentuan Kadar Air



L.2.3 Ekstraksi Sampel

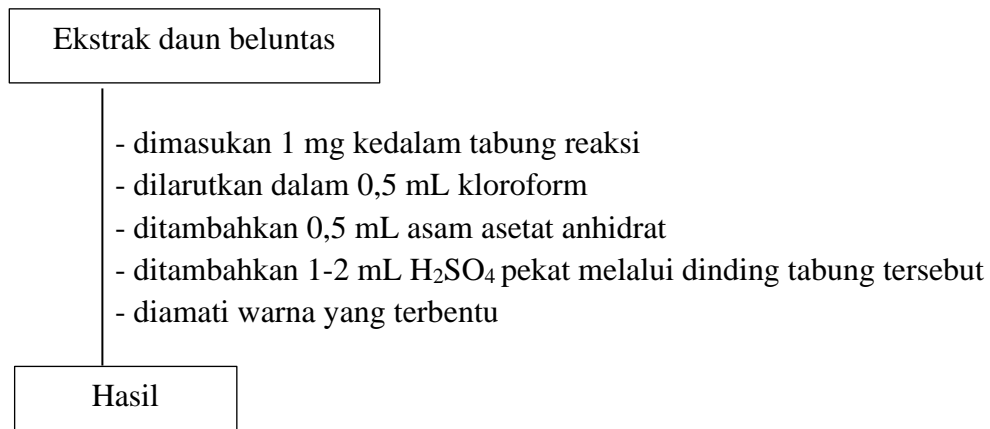


L.2.4 Hidrolisis dan Ekstraksi Cair-Cair

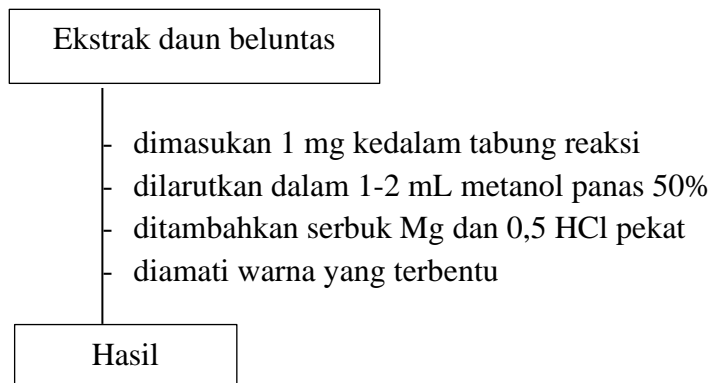


L.2.5 Uji fitokimia

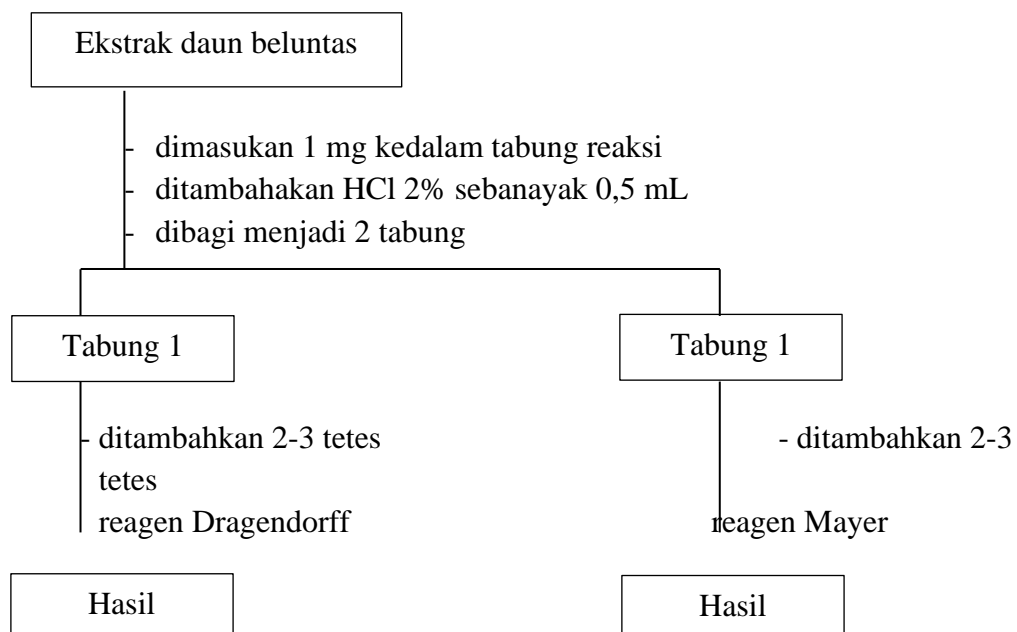
a. Uji Steroid dan Triterpenoid

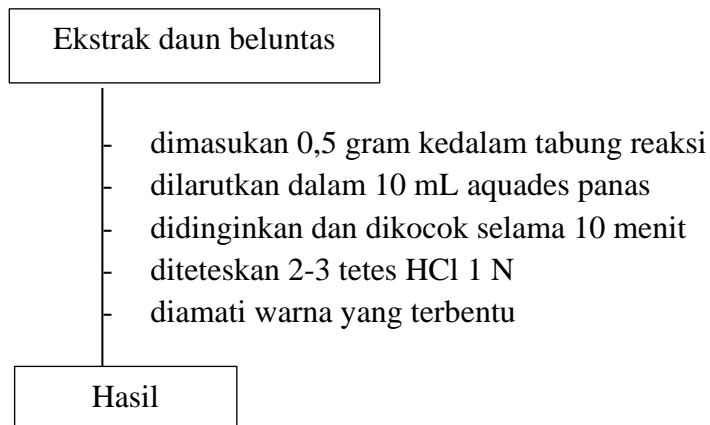
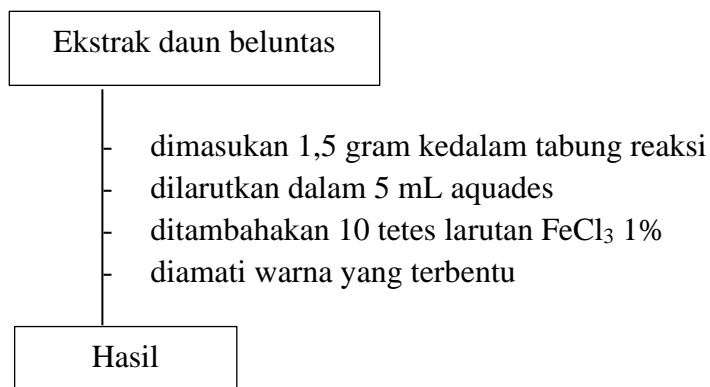
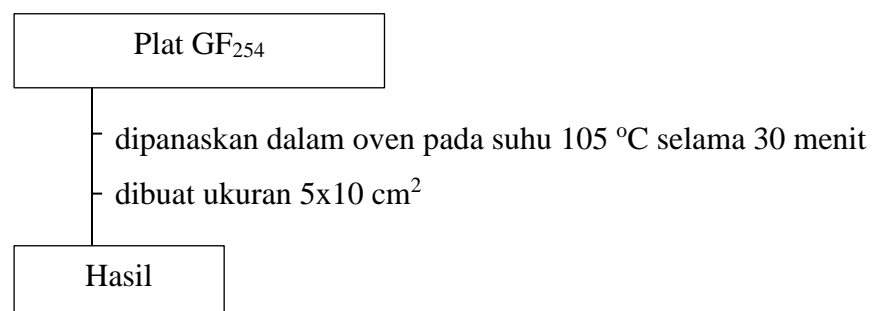


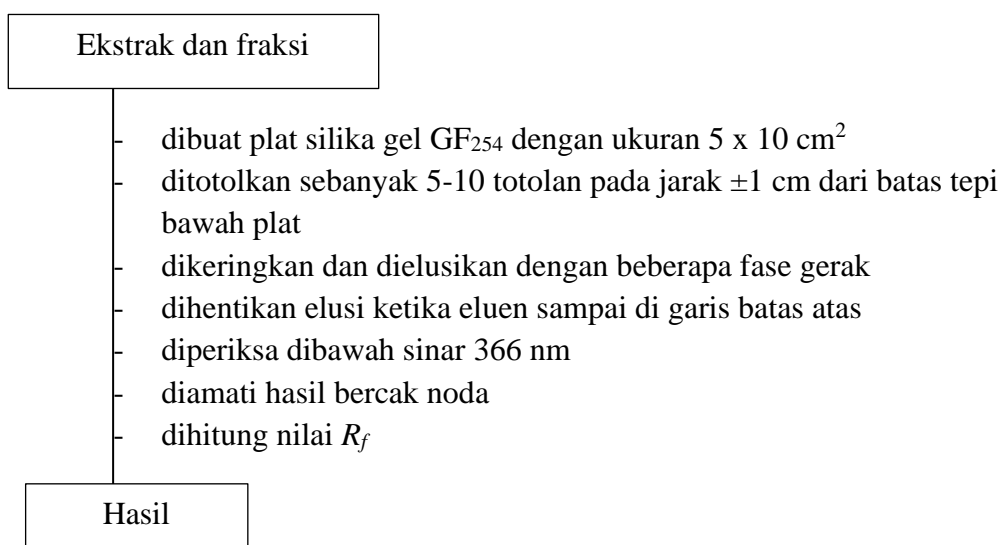
b. Uji Flavonoid



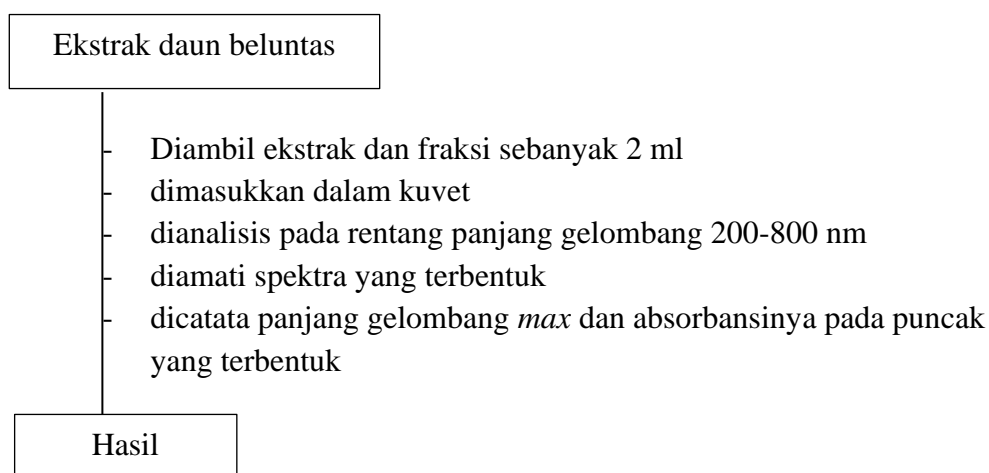
c. Uji Alkaloid



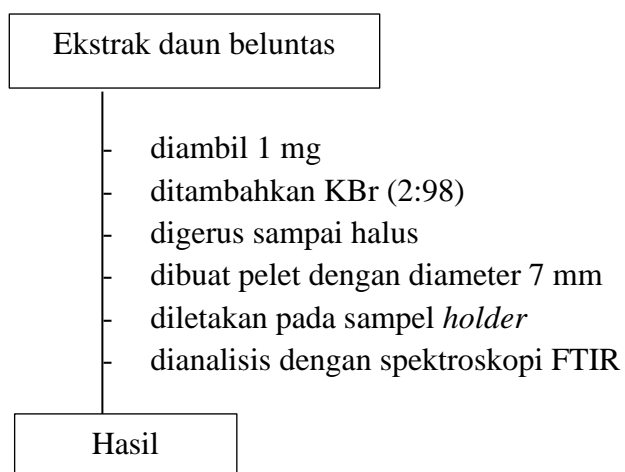
d. Uji Saponin**e. Uji Tanin****L.2.6 Uji Senyawa Aktif dengan KLTA**



L.2.7 Identifikasi Senyawa Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

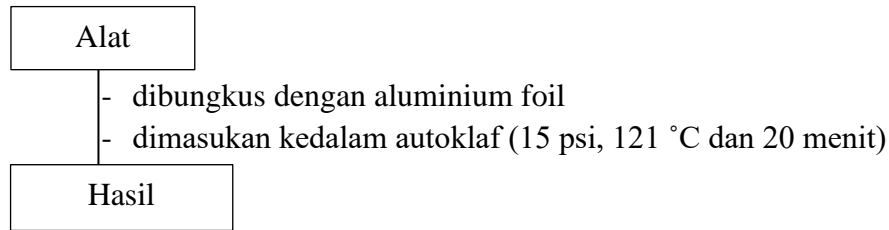


L.2.8 Identifikasi Gugus Fungsi Menggunakan FTIR

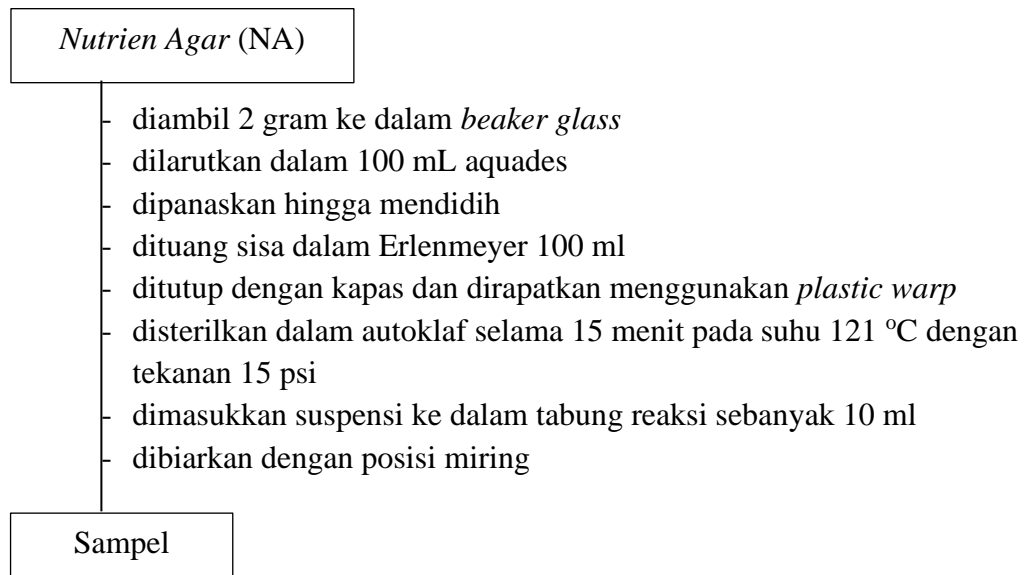


L.2.9 Uji Antibakteri

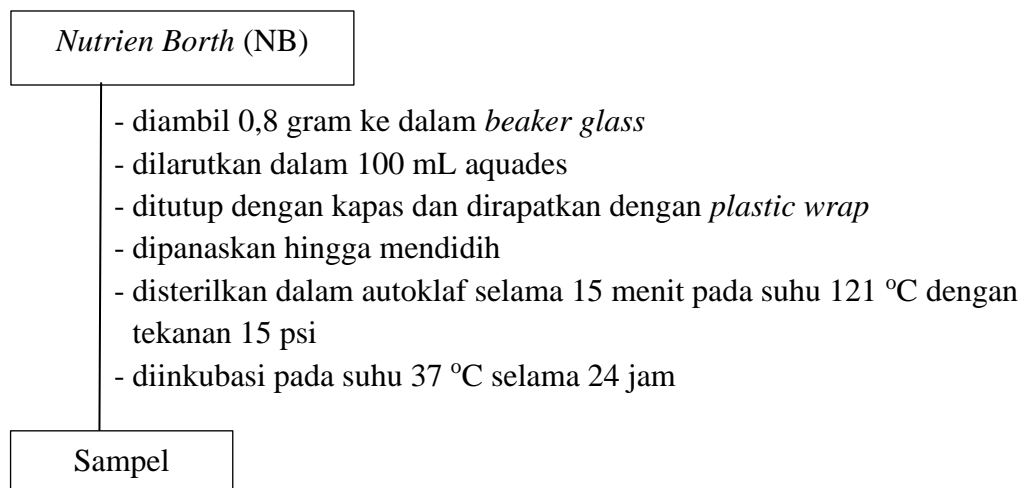
a. Sterilisasi Alat



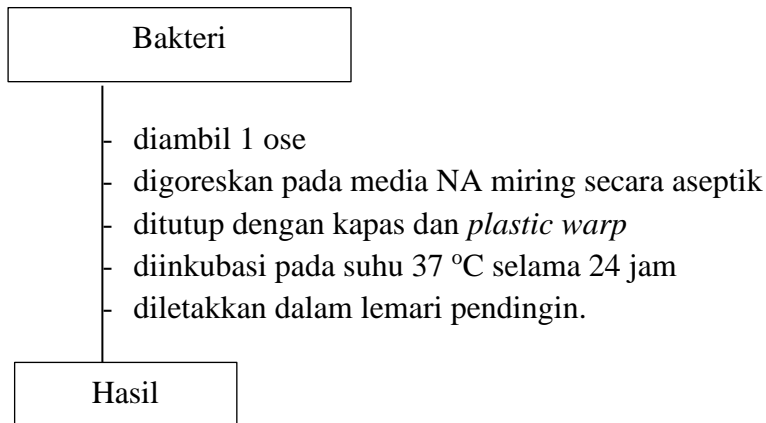
b. Pembuatan Media NA



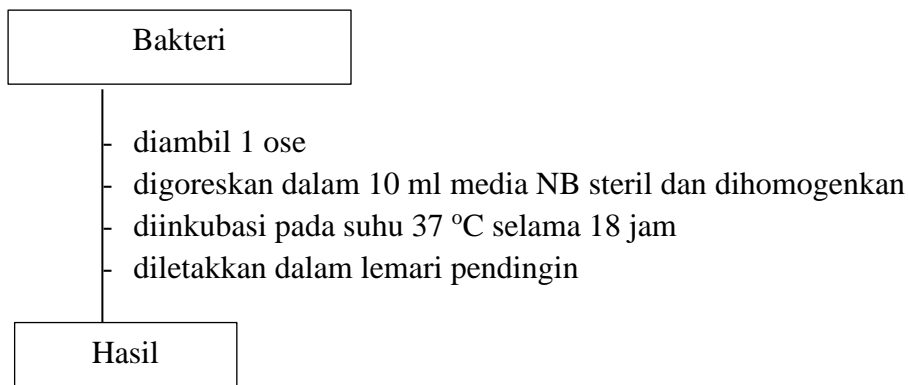
c. Pembuatan Media Cair (NB)



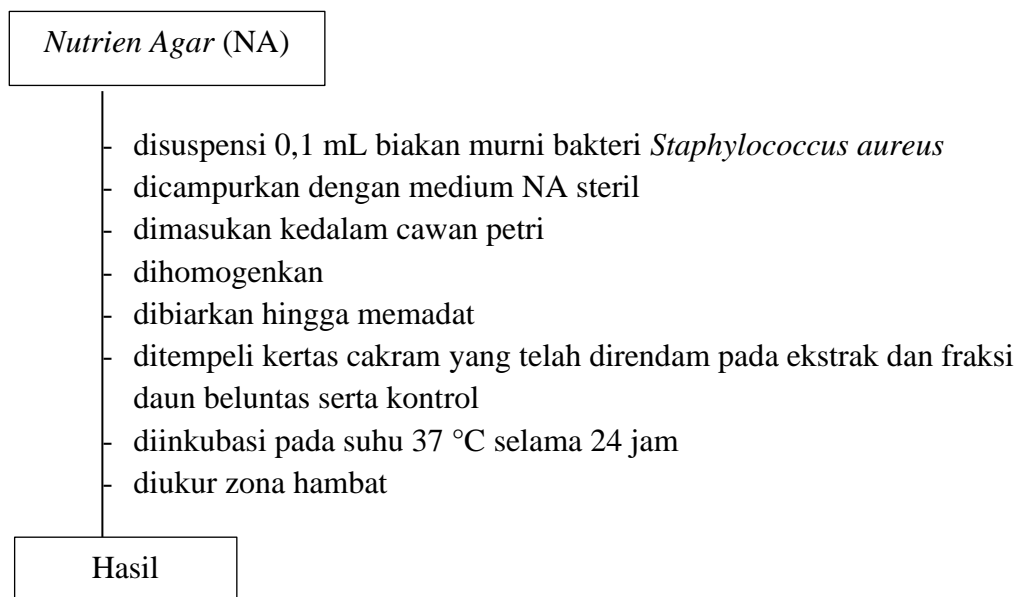
d. Peremajaan Bakteri *Staphylococcus aureus*



e. Pembuatan Larutan Biakan Bakteri



f. Uji Aktivitas Antibakteri



Lampiran 3. Perhitungan

L3.1 Pembuatan Larutan Metanol 50%

$$\begin{aligned}M_1 \times V_1 &= M_2 \times V_2 \\99,8 \% \times V_1 &= 50 \% \times 10 \text{ mL} \\V_1 &= 5 \text{ mL}\end{aligned}$$

Jadi diambil larutan metanol 99,8 % sebanyak 5 mL kemudian diencerkan dengan akuades hingga volume 10 mL.

L3.2 Pembuatan Larutan HCl 2N

$$\begin{aligned}\text{Densitas} &: 1,19 \text{ g/mL} : 1190 \text{ g/L} \\ \text{Konsentrasi} &: 37\% \\ \text{Volume} &: 100 \text{ mL} \\ \text{Mr HCl} &: 36,42 \text{ g/mol} \\ n &: 1 \text{ (jumlah mol ion H}^+\text{)} \\ \text{Normalitas HCl} &: n \times \text{Molaritas HCl} \\ &: 1 \times \frac{37\% \times \text{Densitas HCl}}{\text{Mr HCl}} \\ &: \frac{0,37 \times 1190 \text{ g/L}}{36,42 \text{ g/mol}} \\ &: 12,09 \text{ N}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}N_1 \times V_1 &= N_2 \times V_2 \quad 12,09 \text{ N} \times \\ V_1 &= 2 \text{ N} \times 100 \text{ mL} \\ V_1 &= 16,54 \text{ mL} \\ &= 16,5 \text{ mL}\end{aligned}$$

HCl 2N dalam 100 mL dibuat dengan membutuhkan HCl pekat 37% sebanyak 16,5 mL yang dimasukkan dalam labu ukur 100 mL, selanjutnya ditambahkan aquades hingga tanda batas, kemudian dikocok hingga homogen.

L3.3 Pembuatan HCl 1N

$$\begin{aligned}N_1 \times V_1 &= N_2 \times V_2 \\ 2 \text{ N} \times V_1 &= 1 \text{ N} \times 10 \text{ mL} \\ V_1 &= 5 \text{ mL}\end{aligned}$$

HCl 1N dalam 10 mL dibuat dengan membutuhkan HCl 2N sebanyak 5 mL yang dimasukkan dalam labu ukur 10 mL, selanjutnya ditambahkan aquades hingga tanda batas, kemudian dikocok hingga homogen.

L3.4 Pembuatan HCl 2%

$$\begin{aligned}
 N_1 \times V_1 &= N_2 \times V_2 \\
 37\% \times V_1 &= 2\% \times 10 \text{ mL} \\
 V_1 &= 0,54 \text{ mL}
 \end{aligned}$$

HCl 2% dalam 10 mL dibuat dengan membutuhkan HCl pekat 37% sebanyak 0,54 mL yang dimasukkan dalam labu ukur 10 mL, selanjutnya ditambahkan aquades hingga tanda batas, kemudian dikocok hingga homogen.

L3.5 Pembuatan FeCl₃ 1%

$$\begin{aligned}
 \text{Mr FeCl}_3 &= 162,2 \text{ g/mol} \\
 \text{Massa FeCl}_3 &= \frac{1\% \times \text{Mr} \times V}{22,4} \\
 &= \frac{1\% \times 162,2 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \times 0,01 \text{ L}}{22,4} \\
 &= 0,072 \text{ g} \\
 &= 72 \text{ mg}
 \end{aligned}$$

Larutan FeCl₃ 1% dibuat dengan membutuhkan 72 mg FeCl₃ yang dilarutkan dengan aquades dalam labu ukur 10 mL.

L3.7 Pembuatan Larutan NaHCO₃ 5% (b/v)

Natrium bikarbonat sebanyak 5 gram dilarutkan dengan akuades dalam beaker glass. Kemudian dimasukkan dalam labu takar 100 mL, ditambahkan akuades sampai tanda batas lalu dihomogenkan.

L3.8 Pembuatan Konsentrasi Ekstrak

g. Konsentrasi ekstrak 25 %

$$\text{Massa sampel} = 250 \text{ mg} \times 1 \text{ mL} = 250 \text{ mg} = 0,25 \text{ g}$$

Sebanyak 0,25 g ekstrak dilarutkan dengan pelarutnya sampai volume 1 mL, sehingga diperoleh ekstrak dengan konsentrasi 250 % sebanyak 1 mL.

h. Konsentrasi ekstrak 20 %

$$\text{Massa sampel} = 200 \text{ mg} \times 1 \text{ mL} = 200 \text{ mg} = 0,2 \text{ g}$$

Sebanyak 0,2 g ekstrak dilarutkan dengan pelarutnya sampai volume 1 mL,

sehingga diperoleh ekstrak dengan konsentrasi 20 % sebanyak 1 mL.

i. Konsentrasi ekstrak 15 %

Massa sampel = $150 \text{ mg} \times 1 \text{ mL} = 150 \text{ mg} = 0,15 \text{ g}$

Sebanyak 0,15 g ekstrak dilarutkan dengan pelarutnya sampai volume 1 mL, sehingga diperoleh ekstrak dengan konsentrasi 15 % sebanyak 1 mL.

j. Konsentrasi ekstrak 10 %

Massa sampel = $100 \text{ mg} \times 1 \text{ mL} = 100 \text{ mg} = 0,1 \text{ g}$

Sebanyak 0,1 g ekstrak dilarutkan dengan pelarutnya sampai volume 1 mL, sehingga diperoleh ekstrak dengan konsentrasi 10 % sebanyak 1 mL.

k. Konsentrasi ekstrak 5 %

Massa sampel = $50 \text{ mg} \times 1 \text{ mL} = 50 \text{ mg} = 0,05 \text{ g}$

Sebanyak 0,05 g ekstrak dilarutkan dengan pelarutnya sampai volume 1 mL, sehingga diperoleh ekstrak dengan konsentrasi 5 % sebanyak 1 mL.

Lampiran 8. Dokumentasi Penelitian

L.8.1 Preparasi Daun Beluntas



Pemetikan



Pencucian



Pengeringan



Serbuk Sampel

L.8.2 Analisis Kadar Air



Pengukuran Kadar Air



Pengovenan Serbuk

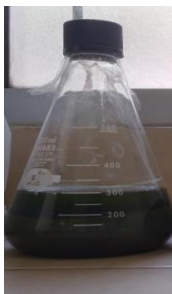


Pengonstanan (desikator)



Penimbangan

L.8.3 Maserasi



Perendaman Sampel



Penyaringan

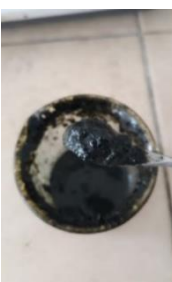


Pemekatan



Pengaliran gas N₂

L.8.4 Hidrolisis dan Partisi



Ekstrak Pekat



Stirer dan Penambahan HCl



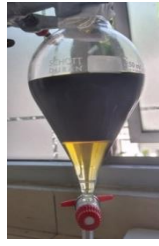
Penambahan NaHCO₃



Ekstrak Pekat Hasil Hidrolisis



Partisi n-Heksana



Partisi Etil Asetat



Fraksi n-Heksana



Fraksi Etil Asetat



Fraksi Air



Fraksi Peekat n-Heksana



Fraksi Peekat Etil Asetat



Fraksi Peekat Air

L.8.5. Fitokimia

| Metabolit Sekunder | Ekstrak Metanol | Fraksi n-Heksana | Fraksi Etil Asetat | Fraksi Air |
|-----------------------|-----------------|------------------|--------------------|------------|
| Steroid/ Terpenoid | (+) | (+) | (+) | (-) |
| Flavonoid | (+) | (-) | (+) | (+) |
| Alkaloid | (+) | (-) | (-) | (-) |
| - Mayer | (+) | (-) | (-) | (-) |
| - Dragendorff | (+) | (-) | (-) | (-) |
| Saponin | (+) | (-) | (+) | (+) |
| Tanin | (+) | (-) | (+) | (-) |

L.8.6 KLTA



Penotolan



Pengelasan



Pengamatan



Larutan KLT

L.8.7. Uji Antibakteri



Media peremanjaan



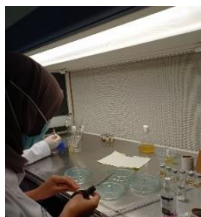
Hasil Peremanjaan



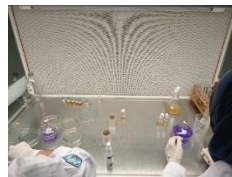
Inokulasi Bakteri



Hasil inokulasi



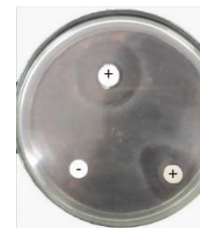
Persiapan Uji Antibakteri



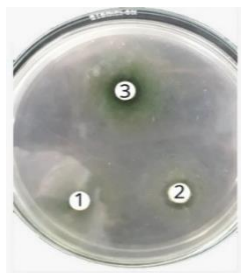
Proses Uji Antibakteri



Penyimpanan pada inkubator



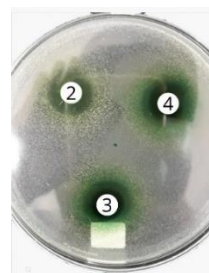
Zona Hambat Kontrol



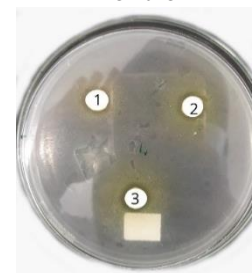
Zona Hambat Ekstrak Metanol



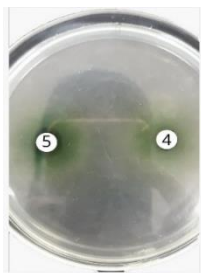
Zona Hambat Fraksi *n*-Heksana



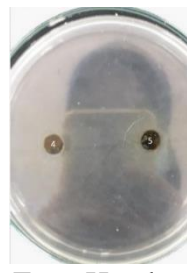
Zona Hambat Fraksi Etil Asetat



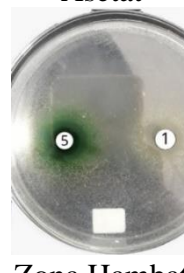
Zona Hambat Fraksi Air



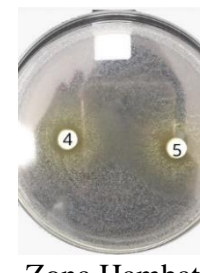
Zona Hambat Ekstrak Metanol



Zona Hambat Fraksi *n*-Heksana



Zona Hambat Fraksi Etil Asetat



Zona Hambat Fraksi Air