

AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL DAN FRAKSI KULIT BATANG BELIMBING WULUH (*Averrhoa bilimbi* Linn.) TERHADAP BAKTERI *Klebsiella pneumoniae* DAN *Staphylococcus epidermidis* BESERTA BIOAUTOGRAFINYA

Muhtadi, Ria Ambarwati, dan Ratna Yuliani
Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta
Correspondence to : DR.Muhtadi.MSi
Email : muhtadi@ums.ac.id

ABSTRACT

Belimbing wuluh (Averrhoa bilimbi Linn.) is a tropical plant that has antibacterial properties. The purpose of this study was to test the antibacterial activity of bark Belimbing wuluh against Klebsiella pneumoniae and Staphylococcus epidermidis and their bioautography. Extraction methods used to research is method maceration with a solvent ethanol 96 %. Fractinations done by method partition liquid-liquid with a separating funnel. Test performed in this research covering identification bacteria, the sensitivity bacteria, antibacterial activity, thin layer chromatography, bioautography. The result of antibacterial activity ethanol extract of disk diffusion method with concentrations 400 µg/disk, 800 µg/disk, 1600 µg/disk is 8±0,5; 10,34±0,58; 12,17±0,76 on Klebsiella pneumoniae, 10,17±0,29; 11±0; 11,5±0 on Staphylococcus epidermidis, n-hexane fraction with concentration 400 µg/disk, 800 µg/disk, 1600 µg/disk is 8,34±0,29; 9,34±0,29; 10,84±0,76 on Klebsiella pneumoniae, 8,5±0,5; 9,34±0,29; 10,67±0,29 on Staphylococcus epidermidis, ethyl acetate fraction with concentration 400 µg/disk, 800 µg/disk, 1600 µg/disk is 9,17±0,29; 10,34±0,29; 11,17±0,29 on Klebsiella pneumoniae and 9,5±0,5; 10,67±0,29; 12,67±1,26 on Staphylococcus epidermidis, ethanol-water fractions with concentration 400 µg/disk, 800 µg/disk, 1600 µg/disk is 8,17±0,29; 9,17±0,29; 10±0 on Klebsiella pneumoniae, 9±0; 9,67±0,29; 10,34±0,29 on Staphylococcus epidermidis. The TLC show chemical compounds contained in the ethanol extract, n-hexan fraction, ethyl acetate fraction, and ethanol-water fraction is a compound of the saponins, alkaloids, flavonoids and phenolic. Bioautography showed that ethanol extracts, n-hexan fraction, ethyl acetate fraction, and ethanol-air fraction Belimbing wuluh (Averrhoa bilimbi Linn.) bark have not antibacterial activity because there is no clear area around on plate TLC.

Keywords: *Belimbing wuluh (Averrhoa bilimbi Linn.), ethanol extract, fractination, antibacterial, bioautografi.*

PENDAHULUAN

Infeksi merupakan penyakit yang sering di jumpai masyarakat di seluruh dunia. Penyakit infeksi sering terjadi di negara beriklim tropis seperti Indonesia. Salah satu penyebab penyakit infeksi bisa disebabkan oleh kuman (Refdanita *et al.*, 2004). Penyakit infeksi disebabkan oleh bakteri secara umum merupakan patogen yang bersifat tidak terlihat atau asimtomatik (Jawetz *et al.*, 1996).

Bakteri yang dapat menyebabkan infeksi diantaranya *Klebsiella pneumoniae* dan *Staphylococcus epidermidis* (Jawetz *et al.*, 2001). *Klebsiella sp* merupakan bakteri Gram negatif yang merupakan penyebab tersering penyakit

infeksi nosokomial (Adisasmito & Hadinegoro, 2004). *Klebsiella pneumoniae* terdapat pada tubuh manusia di bagian saluran napas dan feses pada sekitar 5% orang normal (Jawetz *et al.*, 1996). *Klebsiella pneumoniae* sering dijumpai pada manusia yaitu di bagian usus besar dengan persentase 40%-80% (Pelczar, 1998). *Klebsiella pneumoniae* (basil Friedlander) menyebabkan pneumonia Friedlander's yang termasuk jarang terjadi dan apabila muncul sangat berat pada pengatasannya (Gibson, 1996). *Klebsiella pneumoniae* dapat menyebabkan penyakit pneumonia atau infeksi saluran pernafasan bawah. Hasil sensitivitas *Klebsiella pneumoniae* yang diisolasi dari sputum penderita rawat inap

RSUD Dr. Saiful Anwar Malang 2002 antibiotik yang masih peka terhadap *Klebsiella pneumoniae* adalah gentamisin, siprofloksasin, norfloksasin, dan amikasin (Susilo, 2004).

Staphylococcus epidermidis merupakan anggota flora normal pada kulit manusia, saluran pernapasan, dan saluran pencernaan (Jawetz *et al.*, 1996). *Staphylococcus epidermidis* biotipe-1 menyebabkan infeksi kronis pada manusia (Radji, 2009). Biotipe-2 patogen terhadap babi serta menimbulkan impetigo kontagiosa (kulit melepuh) pada binatang tersebut (Syahrurachman *et al.*, 1994). *Staphylococcus epidermidis* adalah spesies staphylococcus yang paling sering berkaitan dengan bakteremia dan infeksi yang didapat dari rumah sakit dan akhir-akhir ini muncul sebagai penyebab utama infeksi (Gomes, 2011). Sumber infeksi utama oleh *Staphylococcus epidermidis* adalah penumpukan bakteri pada lesi manusia, benda yang terkontaminasi oleh lesi, saluran respirasi, dan kulit manusia (Jawetz *et al.*, 2001).

Banyak penyakit infeksi yang belum bisa disembuhkan karena adanya resistensi terhadap obat sintesis maka dipilih alternatif lain untuk menyembuhkan penyakit. Salah satunya dengan menggunakan tanaman tradisional. Penggunaan obat tradisional secara umum dinilai lebih aman daripada penggunaan obat modern. Hal ini disebabkan karena obat tradisional memiliki efek samping yang relatif lebih sedikit dari pada obat modern (Sari, 2006).

Salah satu tanaman yang digunakan sebagai alternatif dalam pengobatan adalah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.). Tanaman ini telah banyak diteliti untuk penemuan aktivitas antimikroba, antikanker, antioksidan, imunomodulator, dan antiinflamasi (De Smet, 1997 dalam Karon *et al.*, 2011). Belimbing wuluh juga memiliki sifat hipoglikemik, hipotrigliseridemik, antiaterogenik, dan sifat anti-peroksidatif lipid pada tikus diabetes yang diberi streptozotisin setelah 2 minggu pengobatan (Pushparaj, 2000). Tanaman belimbing wuluh memiliki nilai khasiat yang besar sebagai obat alternatif pada penyakit diabetes di hampir seluruh bagian tumbuhan seperti daun, kulit batang, bunga, buah, biji, dan akar (Kumar *et al.*, 2013).

Ekstrak kulit batang belimbing wuluh dengan fraksi metanol, n-heksan, karbon tetra klorid, dan kloroform mempunyai aktivitas antibakteri terhadap beberapa mikroorganisme

antara lain *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, dan *Candida albicans* (Siddique *et al.*, 2013). Batang belimbing wuluh mengandung saponin, tanin, glukosida, kalsium oksalat. Buah belimbing wuluh kaya asam oksalat, dan tanin, dan triterpen. Buah belimbing wuluh ditemukan lima puluh tiga komponen volatil, terutama terdiri dari asam alifatik, asam heksadekanoat, asam 9-oktadekanoat, ester, butil nikotinat dan heksil nikotinat (Chowdhury *et al.*, 2012).

Berdasarkan penelitian sebelumnya tersebut, maka perlu dilakukan penelitian lanjut untuk mengetahui aktivitas antibakteri fraksi n-heksan, etil asetat, etanol-air dari ekstrak etanol kulit batang belimbing wuluh terhadap bakteri *Klebsiella pneumoniae* dan *Staphylococcus epidermidis*. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan sumbangan bagi ilmu pengetahuan dan masyarakat luas sehingga dapat dikembangkan pemanfaatan kulit batang belimbing wuluh sebagai obat tradisional antibakteri.

METODE PENELITIAN

Alat. Alat-alat yang digunakan dalam penelitian adalah inkubator (Memmert®), inkubator shaker (Excella 24®), lampu UV (Philips®), *vacuum rotary evaporator* (Heidolph®), *waterbath* WNB-14 (Memmert®), corong pisah, cawan porselen, neraca analitik (Ohaus®), autoklaf (MA 672®), oven (Memmert®), Laminar Air Flow (Astari Niagara®), tabung reaksi (Pyrek®), vortex (Thermolyne), pipet volume (Pyrek®), pipet ukur, erlenmeyer, cawan petri, ose, *beaker glass*, mikropipet, batang pengaduk, bunsen, bejana kromatografi, mikropipet, pipa kapiler.

Bahan. Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian adalah kulit batang belimbing wuluh yang diperoleh dari daerah Gonilan, Kartasura, Sukoharjo, n-heksan, etil asetat, etanol-air, *Klebsiella pneumoniae* dan *Staphylococcus epidermidis* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Umum Universitas Sebelas Maret, etanol 96%, media Mueller Hinton (MH) (Oxoid), media Brain Heart Infusion (BHI) (Oxoid), cat Gram A, cat Gram B, cat Gram C, cat Gram D dan formalin 1%, *blue tips*, *yellow tips*, media KIA (Klinger Iron Agar), LIA (Lysine Iron Agar), MIO (Motility Indol Ornithine), MSA (Mannitol Salt Agar), pereaksi Dragendorff, LB (Liebermann Burchard), FeCl₃ dan sitroborat.

Jalannya Penelitian

1. Pembuatan ekstrak etanol dan fraksi kulit batang belimbing wuluh.

a. Ekstraksi

Kulit batang belimbing wuluh yang telah kering \pm 1 kg direndam dalam etanol 96% sebanyak 7,5 liter selama 3 hari sambil diaduk, setelah direndam selama 3 hari disaring dengan kertas saring dan corong Buchner, lalu ampas yang didapat diremaserasi, maserat yang didapat dievaporasi dengan rotary evaporator pada suhu 50°C lalu diuapkan diatas *waterbath* hingga didapat ekstrak kental.

b. Fraksinasi

Ekstrak kental 10 gram dilarutkan dalam 100 mL etanol, dimasukkan ke dalam corong pisah kemudian ditambah n-heksan sebanyak 100mL untuk dilakukan pengawalleman setelah itu dikocok dan dipisahkan lapisan n-heksan dan etanol-air, dilakukan berulang hingga n-heksan jernih. Fraksinasi etil asetat dengan ditambah etil asetat sebanyak 100 mL dimasukkan ke dalam corong pisah kemudian dikocok perlahan hingga didapat 2 lapisan, dilakukan berulang hingga etil-asetat jernih. Fraksinasi dari etil asetat didapat 2 lapisan yaitu lapisan bening (bawah) dijadikan fraksi etil asetat sedangkan lapisan yang kental (atas) dijadikan fraksi etanol-air (sisa). Hasil dari fraksinasi diuapkan pada suhu 50-60°C kemudian dikentalkan di atas *waterbath* pada suhu 60°C untuk uji antibakteri, uji KLT, dan uji bioautografi.

2. Pembuatan media

Media yang digunakan adalah KIA, LIA, MIO, MH, BHI dan MSA. Kligler Iron Agar ditimbang 3,5 g dilarutkan dalam 100 mL akuades, LIA ditimbang 3,4 g dilarutkan dalam 100 mL akuades, MIO ditimbang 3,1 g dilarutkan dalam 100 mL akuades, MH ditimbang 3,8g dilarutkan dalam 100 mL akuades, BHI ditimbang 3,7 g dilarutkan dalam 100 mL akuades, MSA ditimbang 11,1 g dilarutkan dalam 100 mL akuades. Media KIA, LIA, MIO, MH, BHI dan MSA yang telah dilarutkan dengan akuades disterilkan dengan autoklaf selama 20 menit dengan suhu 120°C dalam autoklaf lalu diambil dan disimpan di kulkas sebagai stok media.

3. Pemeliharaan bakteri

Bakteri induk didapat dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran UNS diambil satu ujung mata ose kemudian digoreskan pada media MH, diinkubasi pada suhu 37° C selama 18-24 jam. Setelah koloni tumbuh kemudian disimpan pada lemari es pada suhu 4° C dan digunakan sebagai stok bakteri.

4. Pembuatan suspensi bakteri

Dari hasil biakan, diambil 3-5 koloni bakteri dari stok kemudian disuspensikan dalam 5 mL BHI steril kemudian dishaker selama 2 jam. Lalu kekeruhan disamakan dengan standar Mc Farland $1,5 \times 10^8$ CFU/mL dengan mensuspensikannya ke dalam larutan salin sehingga akan memiliki kekeruhan yang sama dengan standar Mc Farland.

5. Pembuatan Seri Konsentrasi

Larutan uji dibuat menjadi 3 seri konsentrasi yaitu 16%, 8%, dan 4%. Konsentrasi 16% diperoleh dengan menimbang 160 mg sampel dilarutkan dengan 1 mL DMSO, konsentrasi 8% diperoleh dengan menimbang 80 mg sampel dilarutkan dengan 1 mL DMSO, dan konsentrasi 4% diperoleh dengan menimbang 40 mg sampel dilarutkan dengan 1 mL DMSO.

6. Identifikasi bakteri

Suspensi bakteri diambil 1 ujung mata ose dan diratakan pada gelas obyek yang telah dibebaslemakkan dengan dipanasi di atas nyala Bunsen hingga kering kemudian ditetesi formalin 1% ditunggu 5 menit kemudian dikeringkan lagi dan preparat siap dicat. Preparat yang telah siap dicat digenangi dengan cat Gram A selama 1-3 menit kemudian digenangi cat Gram B selama 0,5-1 menit, setelah itu cat dibuang dan dicuci dengan air. Preparat kemudian ditetesi cat Gram C sampai warna cat dilunturkan. Setelah itu preparat digenangi cat Gram D selama 1-2 menit kemudian dicuci dan dikeringkan dalam udara kamar. Preparat siap diperiksa di bawah mikroskop dengan pembesaran 1000 kali.

7. Aktivitas Antibakteri dengan Metode Difusi

Media MH sebanyak 20 mL dipadatkan dalam cawan petri, kemudian 250 μ L suspensi bakteri $1,5 \times 10^8$ CFU/mL dimasukkan dan

diratakan dengan *spreader glass*. Masing-masing dari konsentrasi 4% b/v, 8% b/v dan 16% b/v diambil 10 µL dan dimasukkan dalam disk yang kosong, sehingga disk mengandung ekstrak dan fraksi sebesar 400 µg, 800 µg, 1600 µg. Disk diletakkan di atas media dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37° C. Disk standar siprofloksasin 5 µg /disk sebagai kontrol positif pada bakteri *Staphylococcus epidermidis*, gentamisin 10 µg /disk sebagai kontrol positif pada bakteri *Klebsiella pneumoniae*, dan DMSO sebagai kontrol negatif. Aktivitas antimikroba ditentukan dengan mengukur diameter zona hambat dinyatakan dalam mm.

8. Kromatografi Lapis Tipis

Silika gel GF 254 nm yang akan digunakan diaktifkan terlebih dahulu dengan cara dipanasi dalam oven pada suhu 100°C selama 1 jam. Fase diam yang sudah siap kemudian ditotolkan dengan sampel dan dibiarkan sampai kering, selanjutnya dielusi dengan fase gerak kloroform:heksan (8:2) v/v untuk ekstrak etanol, fraksi n-heksan dan fraksi etil asetat dan metanol:etil asetat (5:9) v/v untuk fraksi etanol-air, sehingga dapat menghasilkan pemisahan yang baik. Setelah pengembangan selesai plat diangkat dan dikeringkan sampai pelarut menguap semua.

Bercak pada plat KLT diamati di bawah sinar tampak dan di bawah sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Selanjutnya disemprot dengan beberapa pereaksi semprot seperti Dragendorff, sitroborat, FeCl₃, dan Liebermann Burchard.

9. Bioautografi

Metode bioautografi digunakan untuk mendeteksi senyawa aktif yang mempunyai aktivitas sebagai antibakteri. Metode ini dilakukan dengan cara meletakkan plat hasil elusi pada permukaan media MH yang telah diinokulasi dengan bakteri *Klebsiella pneumoniae* dan *Staphylococcus epidermidis* sebanyak 250 µL selama 20 menit. Plat diangkat kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Bila bercak pada plat hasil elusi tersebut memiliki aktivitas antibakteri maka dengan adanya difusi golongan senyawa aktif akan terbentuk zona jernih.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi dan fraksinasi

Ekstraksi dilakukan untuk mendapatkan zat aktif berkhasiat. Maserasi tergolong metode yang mudah dilakukan dan peralatan yang digunakan sederhana. Proses maserasi tidak memerlukan pemanasan, hanya dengan melarutkan simplisia dalam pelarut etanol 96%, tetapi waktu yang dibutuhkan untuk maserasi cukup lama. Simplisia dilarutkan dalam pelarut etanol 96% selama tiga hari dan diaduk kurang lebih tiga kali dalam sekali maserasi. Berat ekstrak kental yang diperoleh sebanyak 47 g dengan rendemen 4,7%. Fraksinasi dilakukan dengan menggunakan pelarut yang berbeda-beda tingkat kepolarnya. Pelarut yang digunakan untuk fraksinasi adalah n-heksan, elil asetat, dan etanol-air. Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah partisi cair-cair dengan menggunakan corong pisah. Pemilihan fraksinasi dengan corong pisah dilakukan karena peralatannya sederhana dan tidak membutuhkan waktu yang lama. Hasil yang diperoleh fraksi n-heksan 3,24 g dengan rendemen 16,2%, etil asetat 2,91 g dengan rendemen 14,55%, dan etanol-air 12,25 g dengan rendemen 16,25%.

Identifikasi Bakteri

Tujuan dari identifikasi bakteri yaitu untuk memastikan kebenaran bahwa bakteri yang dipakai benar bakteri *Klebsiella pneumoniae* dan *Staphylococcus epidermidis*. Hasil pengecatan Gram yang telah diamati di bawah mikroskop menunjukkan bahwa *Klebsiella pneumoniae* berbentuk batang berwarna merah, bakteri *Staphylococcus epidermidis* berbentuk bulat bergerombol serta berwarna ungu.

Aktivitas Antibakteri dengan Metode Difusi

Pengujian dilakukan untuk mengetahui khasiat antibakteri dari kulit batang belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) terhadap bakteri *Klebsiella pneumoniae* dan *Staphylococcus epidermidis*. Metode untuk uji aktivitas antibakteri adalah cara Kirby Bauer (*Metode disc diffusion*) dengan media Mueller Hinton (MH). Pemilihan metode Kirby Bauer pada uji aktivitas antibakteri karena pengerjaannya sederhana. Hasil uji aktivitas antibakteri seperti Tabel 1.

Tabel 1. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, dan etanol-air terhadap bakteri *Klebsiella pneumoniae* dan *Staphylococcus epidermidis*

Sampel	Konsentrasi ($\mu\text{g}/\text{disk}$)	Diameter Zona Hambat (mm)	
		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Ekstrak etanol	400 $\mu\text{g}/\text{disk}$	8 \pm 0,5	10,17 \pm 0,29
	800 $\mu\text{g}/\text{disk}$	10,34 \pm 0,58	11 \pm 0
	1600 $\mu\text{g}/\text{disk}$	12,17 \pm 0,76	11,5 \pm 0
Fraksi n-heksan	400 $\mu\text{g}/\text{disk}$	8,34 \pm 0,29	8,5 \pm 0,5
	800 $\mu\text{g}/\text{disk}$	9,34 \pm 0,29	9,34 \pm 0,29
	1600 $\mu\text{g}/\text{disk}$	10,84 \pm 0,76	10,67 \pm 0,29
Fraksi etil asetat	400 $\mu\text{g}/\text{disk}$	9,17 \pm 0,29	9,5 \pm 0,5
	800 $\mu\text{g}/\text{disk}$	10,34 \pm 0,29	10,67 \pm 0,29
	1600 $\mu\text{g}/\text{disk}$	11,17 \pm 0,29	12,67 \pm 1,26
Fraksi etanol-air	400 $\mu\text{g}/\text{disk}$	8,17 \pm 0,29	9 \pm 0
	800 $\mu\text{g}/\text{disk}$	9,17 \pm 0,29	9,67 \pm 0,29
	1600 $\mu\text{g}/\text{disk}$	10 \pm 0	10,34 \pm 0,29
Kontrol (+) Gentamisin	10 $\mu\text{g}/\text{disk}$	13,34 \pm 2,25	-
Kontrol (+) Siprofloksasin	5 $\mu\text{g}/\text{disk}$	-	31,5 \pm 0
Kontrol (-) DMSO	10 $\mu\text{g}/\text{disk}$	6 \pm 0	6 \pm 0

Tabel 1 menunjukkan bahwa besarnya konsentrasi suatu sampel dapat mempengaruhi hasil diameter zona hambat yang dihasilkan. Ekstrak etanol dengan konsentrasi 4%, 8%, 16% menghasilkan zona hambat 8 \pm 0,5; 10,34 \pm 0,58; 12,17 \pm 0,76 untuk bakteri *Klebsiella pneumoniae* dan 10,17 \pm 0,29; 11 \pm 0; 11,5 \pm 0 untuk *Staphylococcus epidermidis*. Fraksi n-heksan dengan konsentrasi 4%, 8%, 16% menghasilkan zona hambat 8,34 \pm 0,29; 9,34 \pm 0,29; 10,84 \pm 0,76 untuk bakteri *Klebsiella pneumoniae* dan 8,5 \pm 0,5; 9,34 \pm 0,29; 10,67 \pm 0,29 untuk *Staphylococcus epidermidis*. Fraksi etil asetat dengan konsentrasi 4%, 8%, 16% menghasilkan zona hambat 9,17 \pm 0,29; 10,34 \pm 0,29; 11,17 \pm 0,29 untuk bakteri *Klebsiella pneumoniae* dan 9,5 \pm 0,5; 10,67 \pm 0,29; 12,67 \pm 1,26 untuk *Staphylococcus epidermidis*. Fraksi etanol-air dengan konsentrasi 4%, 8%, 16% menghasilkan zona hambat 8,17 \pm 0,29; 9,17 \pm 0,29; 10 \pm 0 untuk bakteri *Klebsiella pneumoniae* dan 9 \pm 0; 9,67 \pm 0,29; 10,34 \pm 0,29 untuk *Staphylococcus epidermidis*. Kontrol positif (gentamisin) untuk bakteri *Klebsiella pneumoniae* menghasilkan zona hambat 13,34 \pm 2,25, kontrol positif (siprofloksasin) untuk bakteri *Staphylococcus epidermidis* 31,5 \pm 0. Kontrol negatif (DMSO) untuk kedua bakteri yakni bakteri *Klebsiella pneumoniae* dan *Staphylococcus epidermidis*

tidak menghasilkan zona hambat karena DMSO tidak mempunyai aktivitas sebagai antibakteri. Sehingga dapat disimpulkan bahwa semakin besar konsentrasi suatu sampel akan semakin besar pula diameter zona hambat antibakteri yang dihasilkan.

Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi Lapis Tipis termasuk analisis kualitatif untuk mengetahui kandungan kimia yang terdapat pada ekstrak etanol dan fraksi kulit batang belimbing wuluh yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri.

Senyawa yang akan dideteksi adalah alkaloid, flavonoid, saponin, dan fenolik. Fase diam yang dipakai adalah silika GF₂₅₄ fase gerak kloroform: heksan (8:2) v/v untuk ekstrak etanol, fraksi n-heksan, dan fraksi etil asetat. Fase gerak metanol:etil asetat (5:9) v/v untuk fraksi etanol-air. Konsentrasi sampel yang digunakan semua sama yakni 40% dengan jarak pengembangan 5 cm. Pengamatan hasil bercak dilihat secara visual, UV 254 nm, UV 366 nm, dan dengan pereaksi semprot. Pereaksi semprot yang digunakan untuk mendeteksi fenolik adalah FeCl₃ yang akan memberikan warna hitam, biru, atau kelabu (Harborne, 1996). Pereaksi semprot sitroborat digunakan untuk mendeteksi senyawa flavonoid, di bawah sinar UV 366 nm terdapat bercak

berfluoresensi kuning atau hijau pada plat KLT (Alam, 2012). Senyawa alkaloid dideteksi dengan pereaksi semprot Dragendorff akan menghasilkan warna coklat atau orange-coklat dilihat dengan pengamatan visual. Senyawa saponin digunakan pereaksi semprot LB (Liebermann-Burchard)

di bawah sinar UV 366 nm akan memberikan warna hijau dan biru yang menandakan adanya senyawa steroid saponin dan akan memberikan warna merah yang menandakan adanya senyawa triterpen saponin (Wagner dan Bladt, 1995).

Tabel 2. Hasil KLT ekstrak etanol kulit batang belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.)

Spot	Rf	Deteksi							Perkiraan Senyawa
		Visual	UV 254	UV 366 (fluoresensi)	FeCl ₃ (Vis)	Sitroborat	LB	Dragendorff	
1	0,4	-	Pemadaman	Hijau	-	Hijau	Hijau	-	Steroid Saponin
2	0,5	-	-	-	-	-	Hijau	-	Steroid Saponin
3	0,54	Kuning	Pemadaman	Kuning	Coklat	Merah	Merah	Kuning	-
4	0,58	Hijau	Pemadaman	Merah	Kelabu	Merah	Kuning	Hijau	Fenolik
5	0,62	-	Pemadaman	Biru	-	Biru	Biru	-	Steroid Saponin
6	0,64	Hijau	Pemadaman	Merah	Kelabu	Merah	Merah	Hijau	Fenolik dan Triterpen
7	0,8	-	-	-	-	Biru	-	-	-
8	0,9	-	-	Biru	-	Biru	Biru	-	-

Berdasarkan tabel 2 ekstrak etanol kulit batang belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) menunjukkan adanya senyawa golongan steroid saponin, fenolik, dan triterpen saponin. Ekstrak etanol kulit batang belimbing wuluh positif mengandung senyawa golongan steroid saponin ditunjukkan dengan terjadi pemadaman di UV 254 nm dan dengan pereaksi semprot Liebermann-Burchard dilihat di UV 366 nm akan memberikan warna hijau dan biru. Ekstrak etanol kulit batang

belimbing wuluh positif mengandung senyawa golongan fenolik dilihat secara visual ditunjukkan dengan pereaksi FeCl₃ akan menunjukkan warna kelabu. Ekstrak etanol kulit batang belimbing wuluh positif mengandung senyawa golongan triterpen saponin ditunjukkan dengan terjadi pemadaman di UV 254 nm dan dengan pereaksi semprot Liebermann-Burchard dilihat di UV 366 nm akan memberikan warna merah.

Tabel 3. Hasil KLT fraksi n-heksan kulit batang belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.)

Spot	Rf	Deteksi							Perkiraan Senyawa
		Visual	UV 254	UV 366 (fluoresensi)	FeCl ₃ (Vis)	Sitroborat	LB	Dragendorff	
1	0,5	Hijau	Pemadaman	Merah	Hijau	Merah	Merah	Hijau	Fenolik
2	0,56	-	Pemadaman	-	Coklat	-	Coklat	-	-
3	0,58	Hijau muda	Pemadaman	Merah	Coklat	Merah	Hijau	Hijau	Steroid Saponin
4	0,6	Hijau	Pemadaman	Biru	-	Biru	Merah	Hijau	-
5	0,62	Hijau	Pemadaman	Coklat	Hijau	Coklat	Coklat	Coklat tua	-
6	0,7	-	Pemadaman	Merah	Hijau	Merah	Merah	Kuning	Fenolik dan alkaloid
7	0,8	-	Pemadaman	Biru	-	Kuning	Merah	-	Flavonoid
8	0,88	-	Pemadaman	Biru	-	Kuning	Biru	-	Flavonoid dan Steroid Saponin

Berdasarkan tabel 3 diatas fraksi n-heksan kulit batang belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) menunjukkan adanya senyawa golongan fenolik, steroid saponin, dan flavonoid. Fraksi n-heksan kulit batang belimbing wuluh positif

mengandung senyawa golongan fenolik dilihat secara visual ditunjukkan dengan pereaksi FeCl₃ akan menunjukkan warna hijau. Fraksi n-heksan kulit batang belimbing wuluh positif mengandung senyawa golongan steroid saponin ditunjukkan

dengan terjadi pepadaman di UV 254 nm dan dengan pereaksi semprot Liebermann-Burchard dilihat di UV 366 nm akan memberikan warna hijau dan biru. Fraksi n-heksan kulit batang

belimbing wuluh positif mengandung senyawa golongan flavonoid ditunjukkan dengan bercak berfluoresensi kuning di bawah sinar UV 366 nm dengan pereaksi sitroborat.

Tabel 4. Hasil KLT fraksi etil asetat kulit batang belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.)

Spot	Rf	Deteksi							Perkiraan Senyawa
		Visual	UV 254	UV 366 (fluoresensi)	FeCl ₃ (Vis)	Sitroborat	LB	Dragendorff	
1	0,54	-	-	Hijau	-	Hijau	Orange	-	-
2	0,6	Kuning	Pepadaman	Kuning	Coklat	Kuning	Hijau tua	Kuning	Steroid Saponin dan flavonoid
3	0,62	Orange	Pepadaman	Kuning	Coklat	Orange	Kuning	Orange	Alkaloid
4	0,64	-	-	Biru	-	Biru	Biru	-	Steroid Saponin
5	0,8	-	-	Biru	-	Biru	Biru	-	Steroid Saponin

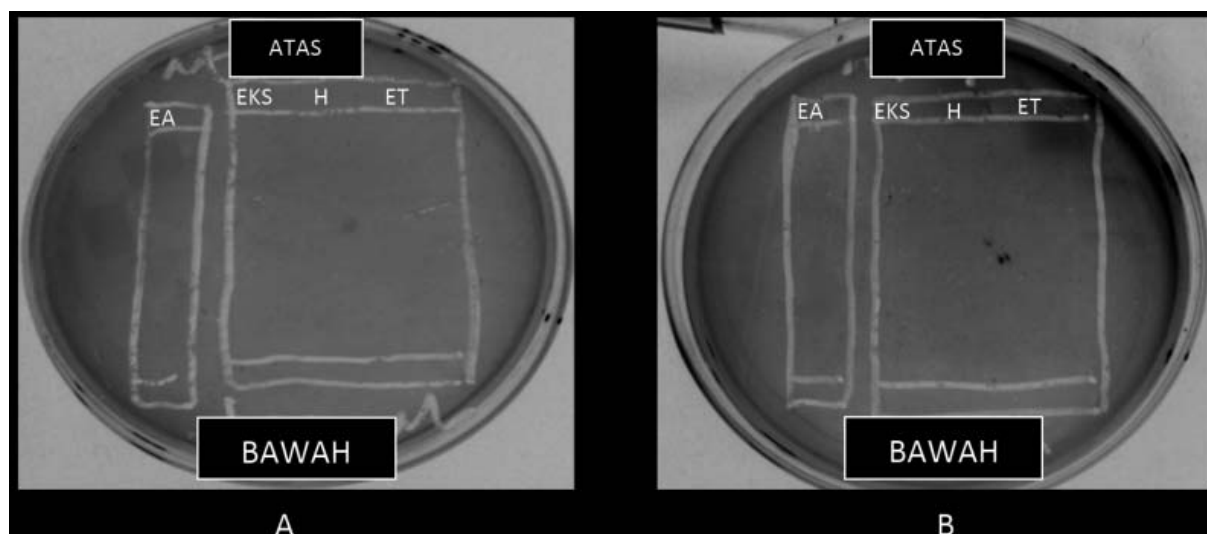
Berdasarkan tabel 4 diatas fraksi etil asetat kulit batang belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) menunjukkan adanya senyawa golongan steroid saponin, alkaloid, dan flavonoid. Fraksi etil asetat kulit batang belimbing wuluh positif mengandung senyawa golongan steroid saponin ditunjukkan dengan pereaksi semprot Liebermann-Burchard yang dilihat di UV 366 nm akan memberikan warna hijau dan biru. Fraksi etil asetat kulit batang belimbing wuluh positif mengandung senyawa golongan alkaloid dideteksi dengan pereaksi semprot Dragendorff akan menghasilkan warna orange yang dilihat dengan pengamatan visual. Fraksi etil asetat kulit batang belimbing wuluh positif mengandung senyawa golongan flavonoid dideteksi dengan pereaksi semprot sitroborat

di bawah sinar UV 366 nm terdapat bercak berfluoresensi kuning.

Hasil dari KLT dapat diketahui bahwa ekstrak etanol, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat didapat spot pada plat sehingga dapat dipastikan terdapat senyawa yang terkandung dalam sempel tersebut sedangkan fraksi etanol-air tidak terdapat spot pada plat diduga sampel tidak terdapat senyawa yang terkandung didalamnya.

Uji Bioautografi

Bioautografi termasuk metode yang spesifik dalam mendeteksi golongan senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol dan kulit batang belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil uji bioautografi ekstrak etanol dan fraksi kulit batang belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) terhadap bakteri *Klebsiella pneumoniae* (A) dan *Staphylococcus epidermidis*

Keterangan:**Eks : Ekstrak ET : Etil asetat****H : Heksan EA : Etanol-air**

Hasil uji yang didapat dengan konsentrasi masing-masing sampel 40% ekstrak etanol dan fraksi kulit batang belimbing wuluh tidak menghasilkan area jernih di sekitar toloan yang menghambat pertumbuhan bakteri. Hal tersebut kemungkinan terjadi karena konsentrasi sampel masih rendah, penotolan sampel kurang banyak, dan pada saat penempelan plat pada media agar waktu yang dibutuhkan kurang lama sehingga sampel belum sepenuhnya meresap pada media tersebut.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil dari penelitian dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut:

Ekstrak etanol, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi etanol-air dari ekstrak etanol kulit batang belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Klebsiella pneumoniae* dan *Staphylococcus epidermidis*.

Ekstrak etanol kulit batang belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) mengandung senyawa fenolik, steroid saponin, dan triterpen saponin, Fraksi n-heksan kulit batang belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) mengandung senyawa fenolik, flavonoid, dan saponin, fraksi etil asetat kulit batang belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) mengandung senyawa steroid, alkaloid, dan flavonoid.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan bagian lain dari pohon belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) serta menggunakan bakteri lain dan dilakukan pemilihan fase gerak untuk fraksi etanol-air agar bisa mendeteksi senyawa apa yang terkandung dalam fraksi etanol-air.

DAFTAR PUSTAKA

- Adisasmito, A. W. & Hadinegoro, S. R. S., 2004, Infeksi Bakteri Gram Negatif di ICU Anak: Epidemiologi, Manajemen Antibiotik dan Pencegahan, *Sari Pediatri*, 6 (1), 32-39.
- Alam, G., Mufidah., Nasrum, M., Felix, K. & Umar., 2012, Skrining Komponen Kimia Dan

Uji Aktivitas Mukolitik Ekstrak Rimpang Bangle (*Zingiber purpureum* Roxb.) Terhadap Mukosa Usus Sapi Secara *In Vitro*, *Majalah Farmasi dan Farmakologi*, 16 (3), 123 – 126.

- Chowdhury, S. S., Uddin, G. M., Mumtahana, N., Hossain, M. & Hasan, S. R. M., 2012, In Vitro Antioxidant and Cytotoxic Potential of Hydromethanolic Extract of *Averrhoa bilimbi* L. Fruits, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 3 (7), 2263-2268.
- De Smet, P. A., 1997. The Role of Plant Derived Drugs and Herbal Medicines in Healthcare, *Drugs*, 54, 108.
- Gibson, J. M., 1996, *Mikrobiologi dan Patologi Modern untuk Perawat*, diterjemahkan oleh Soma, P., 1, Jakarta, Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Gomes, F., B. Leite, P. Teixeira & Oliveira, R., 2011, Strategies to control *Staphylococcus epidermidis* biofilms, *Journal of Science against microbial pathogens*, 843-852
- Jawetz, E, J. L., Adelberg, E. A., 1996, *Mikrobiologi Kedokteran*, Edisi XXII, Diterjemahkan oleh Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Jakarta, Penerbit Salemba Medika.
- Jawetz, E, J. L., Adelberg, E. A., 2001, *Mikrobiologi Kedokteran*, Edisi XXII, Diterjemahkan oleh Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Jakarta, Penerbit Salemba Medika.
- Jawetz, E, J.L., Adelberg, E. A., 2005, *Mikrobiologi Kedokteran*, Edisi XXII, Diterjemahkan oleh Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Jakarta, Penerbit Salemba Medika.
- Karon, B., Ibrahim, M., Mahmood, A., Huq, M., Chowdhury, U., Hossain, A., et al., 2011, Preliminary Antimicrobial, Cytotoxic and Chemical Investigations of *Averrhoa bilimbi* Linn. and *Zizyphus mauritiana* Lam. *Bangladesh Pharmaceutical Journal*, 14 (2), 127-131
- Kumar, K., Gousia., Anupama, M., & Naveena, L., 2013, A Review On Phytochemical Constituents And Biological Assays of *Averrhoa bilimbi* L., *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science Research*. 3 (4), 136-139.
- Harborne, J. B., 1996, *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*, 2nd ed, diterjemahkan oleh Padmawinata K., Penerbit ITB, Bandung.

- Pelczar, M. J., Chan, E. C. S., 1988, *Dasar-Dasar Mikrobiologi*, diterjemahkan oleh Hadioetomo, R. S. 550-551, Penerbit Universitas Indonesia, Jakarta.
- Pushparaj, P., Tan CH., Tan BKH., 2000, Effects of *Averrhoa bilimbi* leaf extract on blood glucose and lipids in streptozotocin-diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 72, 69-76.
- Radji, D. R. M., 2011, *Buku Ajar Mikrobiologi: Panduan Mahasiswa Farmasi & Kedokteran*, 181 & 201, Jakarta, Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Refdanita., Maksum, R., Nurgani, A., & Endang, P., Pola Kepekaan Kuman Terhadap Antibiotika Di Ruang Rawat Intensif Rumah Sakit Fatmawati Jakarta Tahun 2001-2002, *Makara Kesehatan*, 8 (2), 41-48.
- Roth, Hermann, J. & Gottfried, B., 1998, *Analisis Farmasi*, universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Sari, L. O. R. K., 2006, Pemanfaatan Obat Tradisional dengan Pertimbangan Manfaat dan Keamanan, *Majalah Ilmu Kefarmasian*, 3 (1), 01-07
- Siddque, Uddin, M. M. N., Islam, S., Parvin, S., & Shahriar, M., 2013, Phytochemical Screenings, Thrombolytic Activity and Antimicrobial Properties of the bark extracts of *Averrhoa bilimbi* Linn., *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3 (03), 094-096.
- Susilo, J., Teguh, R. T., & Sumarno., 2004, Deteksi Bakteri *Klebsiella pneumoniae* Pada Sputum Dengan Metode Imunositokimia Menggunakan Anti Outer Membran Protein Berat Molekul 40 kDa *Klebsiella pneumoniae* Sebagai Antibodi., *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, 20 (1), 12-18.
- Syahrurachman, A., Sujudi., Karuniawati, A., Santoso, A. U. S., & Asmono, N., 1994, *Buku Ajar Mikrobiologi Kedokteran*, Jakarta, Binarpa Aksara.
- Voight, 1995, *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*, diterjemahkan oleh Noerono, Edisi V, Gajah Mada University Press, Yogyakarta.
- Wagner, H., & Bladt, S., 1996, *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas, Second Ed.*, 350, New York, Spring.