

Fraksi Aktif Antibakteri dari Ekstrak Etanolik Daun Johar (*Cassia siamea* Lam.) terhadap *Staphylococcus epidermidis* dan Bioautografinya

Active Antibacterial Fraction from Ethanolic Extract of Johar Leaves (*Cassia siamea* Lam.) against *Staphylococcus epidermidis* and Its Bioautography

Rima Munawaroh^{1*}, Khoirunnisa¹

¹Laboratorium Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta, Sukoharjo, Indonesia

*E-mail: rima.munawaroh@ums.ac.id

Received: 17 Desember 2023; Accepted: 26 Desember 2023; Published: 30 Desember 2023

Abstrak

Daun Johar (*Cassia siamea* Lam.) telah digunakan secara tradisional untuk mengobati gatal karena memiliki aktivitas antibakteri. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi fraksi aktif dari ekstrak etanolik daun Johar terhadap *Staphylococcus epidermidis* serta golongan senyawa aktif yang berperan. Proses ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan etanol 96%. Metode ekstraksi cair-cair digunakan untuk memisahkan fraksi n-heksana, etil asetat, dan air. Ekstrak dan fraksi yang dihasilkan dinilai aktivitas antibakterinya dengan menggunakan metode difusi sumur. Sampel sebanyak 4 mg, 2 mg, dan 1 mg per sumur digunakan, dengan DMSO sebagai kontrol negatif dan kloramfenikol 6 mg sebagai kontrol positif. Hasil pengujian menunjukkan bahwa fraksi etil asetat lebih efektif daripada ekstrak. Secara spesifik, fraksi tersebut menghasilkan zona hambat sebesar $13,5 \pm 0,5$ mm pada *loading dose* 4 mg/sumuran, sedangkan ekstrak hanya menghasilkan zona hambat sebesar $9,3 \pm 1,2$ mm pada *loading dose* yang sama. Selain itu, terdapat perbedaan yang signifikan pada diameter zona hambat antar kelompok perlakuan pada $p < 0,05$. Hasil KLT menunjukkan bahwa fraksi etil asetat daun johar mengandung senyawa alkaloid, fenolik, flavonoid, dan steroid dengan fase diam silika gel 60 F₂₅₄ dan fase gerak kloroform:etil asetat:etanol (7:2:1 v/v/v). Hasil bioautografi menunjukkan bahwa senyawa fenolik dan alkaloid pada Rf 0,22 serta senyawa fenolik pada Rf 0,42 bertanggung jawab terhadap antibakteri.

Kata Kunci: antibakteri, *Cassia siamea*, fraksinasi, bioautografi, *Staphylococcus epidermidis*

Abstract

Johar leaves (*Cassia siamea* Lam.) have been traditionally used to treat pruritus due to their antibacterial properties. This study aims to identify the active fraction of an ethanolic extract of Johar leaves against *Staphylococcus epidermidis*, as well as the active chemical class. The extraction process involved maceration with 96% ethanol. The liquid-liquid extraction method was used to separate the n-hexane, ethyl acetate, and water fractions. The resulting extract and fraction were assessed for antibacterial activity using the well diffusion method. Sample loadings of 4 mg, 2 mg and 1 mg per well were used, with DMSO as a negative control and 6 mg chloramphenicol as a positive control. The test results indicate that the ethyl acetate fraction is more effective than the extract. Specifically, the fraction produced an inhibition zone of 13.5 ± 0.5 mm at a loading of 4 mg/well, while the extract only produced an inhibition zone of 9.3 ± 1.2 mm at the same loading. Additionally, there was a significant difference in the diameter of the inhibitory zone between treatment groups at $p < 0.05$. The TLC results indicate that the ethyl acetate fraction of Johar leaves contains alkaloid, phenolic, flavonoid, and steroid compounds when using silica gel 60 F₂₅₄ stationary phase and chloroform:ethyl acetate:ethanol (7:2:1 v/v/v) mobile phase. Bioautography results showed that the phenolic and alkaloid compounds at Rf 0.22 and phenolic compound at Rf 0.42 are responsible for the antibacterial activity against *Staphylococcus epidermidis*.

Keywords: antibacterial, *Cassia siamea*, fractionation, bioautography, *Staphylococcus epidermidis*

PENDAHULUAN

Bahan alam terus dikembangkan untuk memenuhi kebutuhan biologis termasuk untuk mekanisme pertahanan endogen dan interaksi dengan organisme lain sehingga memegang peran penting dalam penemuan obat terutama pada kanker dan penyakit infeksi. Wawasan tentang efikasi dan keamanan bahan alam dapat diamati pada penggunaannya dalam pengobatan tradisional (Atanasov *et al.*, 2021). Bahan alam yang digunakan dalam pengobatan salah satu sumbernya berasal dari tumbuhan (Saifudin, 2014). Aktivitas yang dihasilkan oleh tumbuhan berasal dari metabolit primer dan metabolit sekunder. Skrining fitokimia dari tumbuhan menunjukkan adanya metabolit sekunder yang meliputi tannin, alkaloid, glikosida, saponin, dan flavonoid. Metabolit sekunder tersebut digunakan untuk mekanisme pertahanan terhadap mikroorganisme, serangga, dan herbivora (Compean & Ynalves, 2014). Johar (*Cassia siamea* Lam.) adalah salah satu tumbuhan yang mengandung metabolit sekunder dengan aktivitas antimikroba.

Johar sering ditanam sebagai pohon peneduh karena berupa tumbuhan berkayu besar. (Laksmi & Hidayati, 2014). Masyarakat telah menggunakan daun johar secara tradisional sebagai obat penyakit kulit. Daun johar untuk mengobati rasa gatal dilakukan dengan mengambil bagian daunnya kemudian direbus sampai mendidih. Air hasil rebusan didiamkan sampai dingin kemudian digunakan untuk mandi (Indriyani & Wulandari, 2015). Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, dan *Staphylococcus aureus* dapat menyebabkan infeksi pada kulit (Sari, 2019). Ekstrak etanol daun johar memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* sebesar 10,14 mm pada konsentrasi 210 ppm/disk (Andayani *et al.*, 2021), *Staphylococcus aureus* sebesar 14,9 mm pada konsentrasi 100%, *Micrococcus luteus* sebesar 12 mm pada konsentrasi 100% (Fitriah *et al.*, 2017).

Fraksinasi cair-cair atau partisi perlu dilakukan pada ekstrak yang memiliki aktivitas biologis karena ekstrak kasar kandungannya masih sangat kompleks. Hasil semua fraksi kemudian dipantau potensinya dengan melakukan uji aktivitas (Saifudin, 2014). Hasil fraksi teraktif dapat dilakukan evaluasi menggunakan teknik KLT-bioautografi. KLT-bioautografi merupakan gabungan antara teknik pemisahan KLT dengan penentuan aktivitas biologis (Wang *et al.*, 2021). Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan fraksinasi ekstrak etanol daun johar dan melakukan KLT-bioautografi fraksi teraktif untuk mengetahui komponen metabolit sekunder yang berperan dalam penghambatan bakteri *Staphylococcus epidermidis*.

METODE PENELITIAN

Alat

Alat yang dipakai terdiri dari serangkaian alat maserasi, neraca analitik (Ohaus), mikroskop (Olympus), *waterbath* (Memmert), rotary evaporator (Heidolph), autoklaf (Hirayama), oven (Memmert), *shaker incubator* (New Brunswick Scientific), *Laminar Air Flow* (CV. Srikandi Laboratory), vortex (Thermolyne Corporation), *cork borer*, inkubator bakteri (Memmert), mikropipet (Socorex), chamber, lampu UV 254 nm, dan lampu UV 366 nm.

Bahan

Bahan yang dipakai terdiri dari daun johar (*Cassia siamea* Lam.) dari Sawahan, Ngemplak, Boyolali, Jawa Tengah; biakan bakteri *Staphylococcus epidermidis* dari Laboratorium Biologi Farmasi UMS; pelarut teknis etanol 96%, n-heksana, etil asetat, akuades, metanol; reagen kristal violet, reagen mordant, reagen *decolorizing agent*, reagen *counterstain*, minyak imersi; media MSA (*Mannitol Salt Agar*), media MHA (*Mueller Hinton Agar*), media BHI (*Brain Heart Infusion*), standar McFarland, larutan salin, DMSO (dimetil sulfoksida); silika gel 60 F₂₅₄, *tips*, reagen FeCl₃, reagen

Dragendorff, reagen Liebermann Burchard, dan reagen Sitroborat.

Determinasi Tanaman

Tanaman Johar dideterminasi di Laboratorium Herbarium B2P2TOOT (Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional) Tawangmangu, Karanganyar.

Ekstraksi

Daun Johar disortasi basah dan dicuci dengan air mengalir selanjutnya dikeringkan di dalam lemari pengering. Sebanyak 500 gram serbuk daun johar direndam dengan 5 L etanol 96% selama 5 hari dan diaduk sesekali. Selanjutnya disaring dan didapatkan maserat I. Ampas kemudian dimaserasi selama 5 hari dengan 2,5 L etanol 96% dan sesekali diaduk. Hasil remaserasi disaring dan didapatkan maserat II. Kedua maserat dicampur kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator* pada temperatur 50°C dan dipekatkan menggunakan *waterbath* temperatur 50°C sehingga didapatkan ekstrak kental (Daeli & Ridho, 2023).

Fraksinasi

Metode ekstraksi cair-cair dilakukan dengan mengambil 5 gram ekstrak kental dan dilarutkan dalam 50 mL metanol:air (9:1 v/v) kemudian dimasukkan dalam corong pisah. N-heksana ditambahkan sebanyak 50 mL dan digojog beberapa kali kemudian didiamkan hingga terbentuk dua lapisan. Lapisan atas diambil dan disebut fraksi n-heksana. Lapisan bawah diuapkan untuk menghilangkan metanolnya selanjutnya dilarutkan dalam 50 mL air dan dimasukkan dalam corong pisah. Etil asetat ditambahkan sebanyak 50 mL dan digojog beberapa kali kemudian didiamkan hingga terbentuk dua lapisan. Lapisan atas diambil dan disebut fraksi etil asetat sedangkan lapisan bawah disebut fraksi air. Setiap penambahan pelarut dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Fraksi yang diperoleh diuapkan dengan *rotary evaporator* pada temperatur 50°C dan dipekatkan menggunakan *waterbath* temperatur 50°C

sehingga didapatkan fraksi kental (Munawaroh *et al.*, 2018).

Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat dari kaca dibungkus kertas dan dimasukkan oven selama 1 jam pada temperatur 170°C. Alat dari logam disterilkan dengan melewatkannya di atas api menyala tidak kurang dari 20 detik. Media, akuades, larutan NaCl, dan tips dimasukkan autoklaf pada temperatur 121°C selama 15 menit (Ningtyas, 2023).

Identifikasi Bakteri

Pewarnaan Gram

Satu ose bakteri diratakan setipis mungkin pada gelas objek selanjutnya preparat dikeringkan di atas nyala api spiritus. Selama 1 menit preparat digenangi reagen kristal violet kemudian dibiarkan catnya mengalir tanpa dicuci dengan air. Selama 1 menit preparat digenangi reagen mordant (Iodine Gram's) kemudian cat dibilas dengan air. Preparat ditetesi *decolorizing agent* (etanol) sampai warna cat tepat luntur. Selama 1 menit digenangi counterstain (Safranin) selanjutnya dibilas dengan air mengalir dan dibiarkan kering (Smith & Hussey, 2005). Preparat yang telah kering dilakukan observasi dengan bantuan minyak imersi dan mikroskop perbesaran 1000 kali.

Uji Manitol

Uji manitol dilakukan menggunakan media selektif MSA. Plates media diinokulasikan bakteri di permukaannya dan diinkubasi pada temperatur 35 ± 2°C selama 24-48 jam (Liofilchem, 2005).

Pembuatan Suspensi Bakteri

Secara *streak plate* satu ose *Staphylococcus epidermidis* digoreskan pada media MSA dan diinkubasi 24 jam pada temperatur 37°C. Selanjutnya diambil 3-5 koloni bakteri kemudian dimasukkan dalam media BHI 5 mL dan diletakkan pada *shaker incubator* selama 2-6 jam, selanjutnya dibandingkan standar McFarland 1,5x10⁸ CFU/mL. Apabila suspensi bakteri terlalu keruh dapat ditambahkan larutan saline sedangkan apabila suspensi bakteri kurang keruh dapat

ditambahkan inokulasi bakteri atau penambahan waktu inkubasi (Leber, 2016).

Pembuatan Kontrol dan Seri Konsentrasi ekstrak/fraksi

DMSO digunakan sebagai kontrol negatif dan kloramfenikol 30% b/v (300 mg kloramfenikol dalam 1 mL etanol 96%) digunakan sebagai kontrol positif, masing-masing sebanyak 20 µL/sumuran. Bakteri *Staphylococcus epidermidis* sensitif terhadap antibiotik kloramfenikol (Fahmi *et al.*, 2014). Masing-masing ekstrak dan fraksi dibuat konsentrasi 20%, 10%, dan 5%. Konsentrasi 20% dibuat dengan mengambil 200 mg ekstrak atau fraksi kemudian dilarutkan DMSO hingga 1 mL, selanjutnya konsentrasi 10% dibuat dengan mengambil 500 µL campuran tersebut dan ditambahkan DMSO hingga 1 mL. Konsentrasi 5% dibuat dengan mengambil 500 µL konsentrasi 10% dan ditambahkan DMSO hingga 1 mL. *Loading* volume sampel tiap sumuran sebanyak 20 µL sehingga diperoleh *loading* ekstrak atau fraksi tiap sumuran 4 mg, 2 mg, dan 1 mg. *Loading* kloramfenikol (kontrol positif) sebanyak 6 mg/sumuran.

Uji Aktivitas Antibakteri

Metode difusi sumuran dipilih sebagai metode uji aktivitas antibakteri. Suspensi bakteri sebanyak 200 µL diinokulasi pada media MHA yang telah memadat dan diratakan menggunakan *spreader glass*. Hasil inokulasi didiamkan selama 10 menit. Selanjutnya dibuat 5 sumuran berdiameter 6 mm dengan *cork borer*. Ekstrak atau fraksi konsentrasi 20%, 10%, 5%, dan kontrol dimasukkan sebanyak 20 µL ke dalam sumuran kemudian diinkubasi pada temperatur 37°C selama 24 jam (Balouiri *et al.*, 2016). Pengujian dilakukan dengan replikasi sebanyak 3 kali. Adanya zona jernih di sekeliling sumuran menandakan adanya zona hambat. Pengukuran menggunakan penggaris diameter zona hambat sebanyak 2 kali dari sisi yang berbeda kemudian dihitung rata-ratanya (Bagul & Sivakumar, 2016).

Uji Kromatografi Lapis Tipis

Fase gerak kloroform:etil asetat:etanol (7:2:1 v/v/v) dan fase diam silika gel 60 F₂₅₄ digunakan pada pemisahan fraksi teraktif daun johan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Fase diam silika diaktifkan dengan dimasukkan oven pada temperatur 120°C selama 30 menit. Sampel fraksi dalam etanol 96% ditotolkan pada lempeng KLT kemudian dielusi dengan fase gerak. Hasil elusi dilakukan pengamatan menggunakan sinar UV 254 nm, sinar UV 366 nm, dan reagen semprot serta dihitung R_f tiap bercak (Rubiyanto, 2017).

Uji Bioautografi

Metode bioautografi kontak digunakan dalam uji bioautografi. Sebanyak 200 µL kultur bakteri diratakan pada media MHA menggunakan *spreader glass* dan didiamkan selama 10 menit. Lempeng KLT hasil elusi fraksi teraktif dan lempeng KLT hasil elusi fase gerak saja (kontrol negatif) diletakkan selama 30 menit di atas media kemudian diambil. Selanjutnya media diinkubasi pada temperatur 37°C selama 24 jam. Adanya zona hambat yang timbul dilakukan pengamatan nilai R_f-nya (Wang *et al.*, 2021).

Analisis Data

Analisis SPSS 25 metode Kruskal-Wallis yang dilanjutkan dengan Mann-Whitney pada taraf kepercayaan 0,05 digunakan untuk menganalisis data diameter zona hambat. Fraksi dengan hasil diameter zona hambat terbesar disebut fraksi teraktif. Fraksi teraktif dilakukan KLT dan bioautografi, selanjutnya diamati kesesuaian nilai R_f antara hasil KLT dan bioautografi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Determinasi dilakukan dengan menetapkan kesesuaian tanaman secara makroskopis dari bagian akar, batang, daun, bunga, dan polong untuk memastikan tanaman yang digunakan adalah *Cassia siamea* Lam. Berdasarkan surat keterangan hasil determinasi No. KM.04.02/2/1903/2022 oleh B2P2TOOT Karanganyar, sampel tanaman yang diserahkan merupakan tanaman johan

dengan spesies *Senna siamea* Lam. dengan sinonim *Cassia siamea* Lam.

Ekstraksi dilakukan untuk memisahkan bagian aktif dari jaringan tumbuhan. Etanol 96% merupakan pelarut pilihan untuk tujuan skrining dan mampu mengekstraksi senyawa yang belum diketahui strukturnya (Saifudin, 2014). Hasil ekstraksi didapatkan 127,77 gram ekstrak kental dari 500 gram simplisia, sehingga diperoleh rendemen sebesar 25,55%.

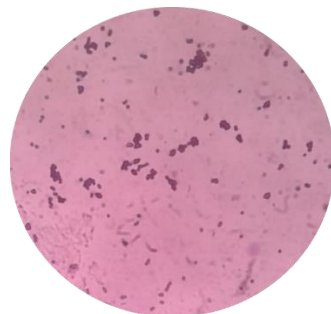
Fraksinasi merupakan proses pemisahan campuran menjadi komponennya berdasarkan perbedaan sifat dan karakteristik komponen individu (Ibrahim, 2018). Fraksinasi dilakukan setelah mendapatkan ekstrak aktif. Pada penelitian ini, metode ekstraksi cair-cair digunakan pada proses fraksinasi dengan menggunakan pelarut yang berbeda polaritasnya sehingga zat yang berada di dalam ekstrak akan terlarut dan terdistribusi ke pelarut sesuai prinsip “like dissolve like”. Pada **Tabel 1** dapat dilihat rendemen tertinggi diperoleh pada fraksi air sedangkan rendemen terendah diperoleh pada fraksi n-heksana. Berdasarkan hasil tersebut, kemungkinan kandungan senyawa pada ekstrak etanol daun johar didominasi oleh senyawa yang bersifat polar.

Pemastian bakteri *Staphylococcus epidermidis* yang digunakan dilakukan dengan identifikasi bakteri. Hasil pewarnaan Gram (**Gambar 1A**) menunjukkan bakteri memiliki koloni berbentuk bulat dan berwarna ungu, hasil tersebut sesuai dengan karakteristik dari *Staphylococcus epidermidis* yang berupa bakteri Gram-positif (Zhou & Li, 2015). Bakteri Gram-Positif memiliki dinding sel yang dapat mengikat kompleks kristal violet-iodine di dalam sel bersama dengan dehidrasi akibat penambahan etanol karena memiliki lapisan peptidoglikan yang tebal sehingga akan tetap berwarna ungu setelah penambahan safranin (Smith & Hussey, 2005). Hasil uji manitol (**Gambar 1B**) menunjukkan koloni yang berwarna merah dengan media yang tidak mengalami perubahan sesuai dengan karakteristik dari *Staphylococcus epidermidis* yang tidak memfermentasi manitol (Liofilchem, 2005).

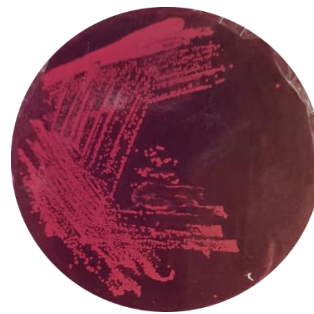
Ekstrak kental dan fraksi kental yang diperoleh dilakukan uji aktivitas antibakteri. Metode difusi sumuran digunakan karena konsentrasi sampel pada metode difusi sumuran lebih tinggi dibandingkan metode difusi disc sehingga terjadi proses osmolaritas secara keseluruhan dan didapatkan tingkat

Tabel 1. Hasil Fraksinasi Ekstrak Etanol Daun Johar (*Cassia Siamea* Lam.)

No	Pelarut	Berat Awal Ekstrak (gram)	Berat Fraksi (gram)	Rendemen (%)
1	N-heksana		2,03	8,0
2	Etil asetat	25,38 g	3,68	14,5
3	Air		12,03	47,4



(A)



(B)

Gambar 1. Hasil identifikasi bakteri *Staphylococcus epidermidis* melalui pewarnaan Gram diamati menggunakan mikroskop perbesaran 1000x (A) dan uji manitol diamati pada media MSA (B)

homogenitas yang tinggi. Selain itu, metode difusi sumuran terjadi kontak langsung antara sampel dengan media yang telah diinokulasikan bakteri. Adanya zona jernih di sekeliling sumuran menandakan adanya zona hambat (Zada & Febriawan, 2021).

Pada penelitian ini pembuatan seri konsentrasi ekstrak etanol dan fraksi n-heksana menggunakan pelarut DMSO 100%, sedangkan seri konsentrasi fraksi etil asetat dan fraksi air menggunakan pelarut DMSO 20%. DMSO dapat melarutkan senyawa dari berbagai tingkat kepolaran dan tidak menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri sehingga dapat digunakan sebagai kontrol negatif (de Brito *et al.*, 2017). Kontrol positif menggunakan

signifikan ($0,000 < 0,005$) sehingga menunjukkan adanya perbedaan bermakna antara rata-rata antar kelompok perlakuan terhadap diameter zona hambat yang dihasilkan. Kelompok perlakuan yang berbeda bermakna dapat diketahui melalui pengujian Mann-Whitney (**Tabel 2**). Hasil pengujian menunjukkan ekstrak etanol dapat menghambat bakteri *Staphylococcus epidermidis* pada *loading* ekstrak terbesar yaitu 4 mg/sumuran; fraksi n-heksan dan fraksi air tidak dapat menghambat bakteri pada semua *loading* ekstrak 1, 2, 4 mg/sumuran; sedangkan fraksi etil asetat dapat menghambat bakteri pada semua *loading* ekstrak 1, 2, 4 mg/sumuran, diameter zona hambatnya semakin besar dengan

Tabel 2. Hasil uji aktivitas antibakteri daun Johar terhadap *Staphylococcus epidermidis*

No	Loading sampel	Diameter zona hambat* (rerata ± SD mm, n=3)			
		Ekstrak etanol	Fraksi n-heksan	Fraksi etil asetat	Fraksi air
1	4 mg/sumuran	9,3 ± 1,2**ab	6,0 ± 0,0	13,5 ± 0,5**c	6,0 ± 0,0
2	2 mg/sumuran	6,5 ± 0,5	6,0 ± 0,0	11,2 ± 1,0**b	6,0 ± 0,0
3	1 mg/sumuran	6,0 ± 0,0	6,0 ± 0,0	8,5 ± 0,9**a	6,0 ± 0,0
K+	Kloramfenikol 6 mg/sumuran	19,8 ± 1,0**d	20,6 ± 0,5**d	19,8 ± 0,8**d	19,5 ± 0,5**d
K-	DMSO 100%, 20 µL	6,0 ± 0,0	6,0 ± 0,0	-	-
	DMSO 20%, 20 µL	-	-	6,0 ± 0,0	6,0 ± 0,0

*Diameter zona hambat termasuk diameter sumuran 6 mm

**Berbeda bermakna terhadap kontrol negatif

a,b,c,d: Tanda huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan yang bermakna

- : tidak dilakukan

kloramfenikol sebagai antibakteri yang bekerja dengan mengikat subunit 50S ribosom, yang menghambat enzim peptidil transferase sehingga mencegah sintesis ikatan peptide akibatnya menghambat pembentukan protein bakteri (Mardiasuti *et al.*, 2021).

Penggunaan kloramfenikol sebagai kontrol positif memperlihatkan adanya zona hambat sedangkan DMSO sebagai kontrol negatif tidak memperlihatkan adanya zona hambat (**Tabel 2**). Penggunaan kontrol positif untuk membandingkan potensi dan validasi metode, sedangkan kontrol negatif untuk memastikan penggunaan pelarut pada seri konsentrasi tidak berkontribusi pada munculnya zona jernih.

Hasil analisis statistik menggunakan metode Kruskal-Wallis menunjukkan nilai p

meningkatnya *loading* ekstrak/sumuran.

Hasil penelitian ini sejalan dengan hasil penelitian Fitriah *et al.* (2017), ekstrak etanol daun johar pada konsentrasi 100% menunjukkan diameter zona hambat terhadap *Staphylococcus aureus* sebesar 14,9 mm dan penelitian Oyebade *et al.* (2021) yang menunjukkan kemampuan antibakteri ekstrak etanol daun johar terhadap *Staphylococcus aureus* pada konsentrasi 50% menghasilkan diameter zona hambat sebesar 10,0 mm.

Fraksi etil asetat adalah fraksi yang memiliki zona hambat diantara ketiga fraksi dari ekstrak etanol daun johar, juga pada *loading dose* 4 mg/sumuran diameter zona hambat fraksi etil asetat lebih besar daripada ekstrak etanolnya (**Tabel 2**). Fraksi teraktif daun johar yang didapatkan ialah fraksi etil

asetat dan lebih poten dibandingkan ekstrak etanol. Oleh karena itu, fraksi etil asetat selanjutnya dilakukan pengujian KLT-Bioautografi.

KLT-Bioautografi merupakan gabungan antara pemisahan KLT dengan penentuan aktivitas biologis. KLT-Bioautografi digunakan untuk menemukan, mengisolasi, dan mengevaluasi bagian aktif dari bahan alam. Hasil elusi KLT dapat menunjukkan pemisahan senyawa sedangkan hasil elusi KLT yang dilanjutkan bioautografi dapat menunjukkan aktivitas antibakteri melalui penampakan zona hambat (Wang *et al.*, 2021).

Fraksi etil asetat daun johar terlebih dahulu dipisahkan menggunakan KLT dengan fase diam silika gel 60 F₂₅₄ dan fase gerak kloroform:etil asetat:etanol (7:2:1 v/v/v). Hasil elusi KLT dan bioautografi dilakukan perhitungan Rf untuk mengamati senyawa yang berkontribusi pada penghambatan pertumbuhan bakteri. Faktor retardasi (*Retardation factor* atau Rf) merupakan perbandingan jarak migrasi analit dengan jarak migrasi eluen yang menunjukkan parameter migrasi senyawa dalam KLT (Rubiyanto, 2017).

fluoresensi dapat terjadi karena senyawa dapat menyerap cahaya dan bereksitasi dari energi rendah menuju energi yang lebih tinggi (Spangenberg *et al.*, 2011).

Alkaloid dideteksi menggunakan reagen Dragendorff dengan ditandai munculnya warna cokelat atau oranye pada sinar tampak. Hasil KLT menunjukkan adanya warna cokelat pada Rf 0,22 dan 0,64 serta oranye pada Rf 0,74. Munculnya warna tersebut karena nitrogen pada alkaloid berikatan dengan ion logam K⁺ (Marliana *et al.*, 2005).

Triterpenoid atau steroid dideteksi menggunakan reagen Liebermann-Burchard (LB) dengan triterpenoid ditandai munculnya fluoresensi ungu, violet, atau merah muda pada UV 366 nm sedangkan steroid ditandai dengan fluoresensi hijau atau biru pada UV 366 nm. Hasil KLT memperlihatkan fluoresensi hijau pada Rf 0,36 dan biru pada Rf 0,54. Munculnya warna tersebut karena reaksi antara asetat anhidrida dari pereaksi LB dengan gugus hidroksil dari steroid sehingga menyebabkan perpanjangan konjugasi (Siadi, 2012).

Fenolik dideteksi menggunakan reagen Besi-III-Klorida (FeCl₃) dengan ditandai

Tabel 3. Hasil KLT fraksi etil asetat daun johar menggunakan fase diam silika gel 60 F₂₅₄ dan fase gerak kloroform:etil asetat:etanol (7:2:1 v/v/v)

No	Rf	UV ₂₅₄	UV ₃₆₆	Dragendorff vis	LB UV ₃₆₆	FeCl ₃ vis	Sitroborat UV ₃₆₆	Interpretasi
1	0,22	P	Biru	Coklat	-	Hitam	-	Alkaloid, Fenolik
2	0,36	P	Biru tua	-	Hijau	-	-	Steroid
3	0,42	P	Cokelat	-	-	Cokelat	-	Fenolik
4	0,54	P	-	-	Biru	-	-	Steroid
5	0,58	P	Kuning	-	Biru	-	-	Steroid
6	0,64	P	Ungu	Coklat	Biru	Hitam	-	Alkaloid, Steroid, Fenolik
7	0,74	P	Oranye	Oranye	-	-	Kuning	Alkaloid, Flavonoid
8	0,86	P	Merah	-	-	-	-	Klorofil

Keterangan:

P = Pemadaman fluoresensi

UV₃₆₆ = fluoresensi

Vis = sinar tampak

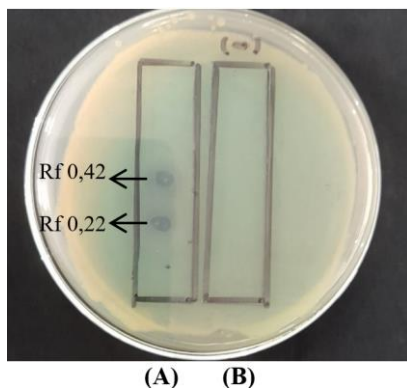
Hasil kromatogram fraksi etil asetat daun johar (**Tabel 3**) memperlihatkan bercak-bercak yang pemadaman fluoresensi pada UV 254 nm disebabkan adanya senyawa dengan ikatan rangkap yang terkonjugasi. Pada UV 366 nm muncul bercak berfluoresensi,

munculnya warna hijau, biru, cokelat, atau kehitaman pada sinar tampak. Hasil KLT menunjukkan adanya warna hitam pada Rf 0,22 dan 0,64 serta warna cokelat pada Rf 0,42. Munculnya warna tersebut karena kandungan fenolik bereaksi dengan Fe³⁺ dari

FeCl₃ sehingga membentuk kompleks trisianoferitrikalium ferri (III) (Ergina & Pursitasari, 2014).

Flavonoid dideteksi menggunakan reagen sitroborat dengan ditandai pada UV 366 nm muncul fluoresensi kuning. Hasil KLT memperlihatkan adanya fluoresensi kuning pada Rf 0,74. Munculnya warna tersebut dengan mekanisme yang belum jelas, kemungkinan dengan terbentuknya kompleks dari boron dan orto hidroksil dari flavonoid (Suhendi *et al.*, 2018)

Kandungan metabolit sekunder dalam fraksi etil asetat daun johan meliputi fenolik, alkaloid, steroid, dan flavonoid (Tabel 3). Hasil ini sesuai dengan penelitian Fitriah *et al.* (2017) yang menyatakan ekstrak etil asetat daun Johar yang diperoleh secara ekstraksi bertingkat daun Johar menggunakan n-heksan, etil asetat, etanol; ekstrak etil asetatnya mengandung alkaloid, tanin/fenolik, dan steroid. Juga sesuai dengan penelitian



Gambar 2. Hasil uji bioautografi fraksi etil asetat (A) dan kontrol negatif (B)

Oyebade *et al.* (2021) yang menyatakan ekstrak etil asetat daun johan hasil maserasi bertingkat dengan cara yang sama seperti di atas, mengandung flavonoid.

Hasil bioautografi menunjukkan adanya zona hambat pada Rf 0,22 dan 0,42 (Gambar 2). Nilai Rf tersebut sama dengan Rf hasil KLT yang menunjukkan adanya senyawa fenolik dan alkaloid pada Rf 0,22 dan fenolik pada Rf 0,42. Oleh karena itu, senyawa dalam fraksi etil asetat yang diduga berperan dalam penghambatan pertumbuhan bakteri *Staphylococcus epidermidis* adalah fenolik dan alkaloid. Kamagate *et al.* (2014) juga menyatakan bahwa senyawa alkaloid, fenolik, dan sterol berperan pada aktivitas antibakteri ekstrak daun johan. Phlobatannins merupakan fenolik yang terkandung dalam daun johan sedangkan alkaloid yang terkandung didalamnya yaitu cassiarin A dan B; siaminine A dan B (Kumar *et al.*, 2017). Mekanisme fenolik-tanin sebagai antibakteri meliputi menghambat enzim bakteri ekstraseluler, menghilangkan substrat yang berperan dalam pertumbuhan bakteri, dan mempengaruhi metabolisme bakteri melalui penghambatan fosforilasi oksidatif (Scalbert, 1991). Alkaloid berperan sebagai antibakteri dengan menghambat DNA topoisomerase (Yan *et al.*, 2021).

KESIMPULAN

Fraksi aktif dari ekstrak etanol daun johan (*Cassia siamea* Lam.) yang mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus epidermidis* adalah fraksi etil asetat. Metabolit sekunder yang berperan di dalam fraksi aktif berdasarkan hasil KLT-bioautografinya adalah fenolik dan alkaloid.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh Universitas Muhammadiyah Surakarta melalui Hibah Integrasi Tridharma (HIT) tahun 2022.

Daftar Pustaka

- Andayani, S., Suprastyani, H., & Leyana, M. (2021). Uji Daya Hambat Ekstrak Kasar Daun Johar (*Cassia siamea* L.) terhadap Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* secara In Vitro. *Journal of Fisheries and Marine Research*, 5(1), 8–14. <https://doi.org/10.21776/ub.jfmr.2021.005.01.2>
- Atanasov, A. G., Zotchev, S. B., Dirsch, V. M., & Supuran, C. T. (2021). Natural Products in

- Drug Discovery: Advances and Opportunities. Springer Nature Limited 2021. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-00114-z>
- Bagul, U. S., & Sivakumar, S. M. (2016). Antibiotic Susceptibility Testing: a Review on Current Practices. *International Journal of Pharmacy*, 6(3), 11–17. <http://www.pharmascholars.com>
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for In Vitro Evaluating Antimicrobial Activity: A Review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Compean, K. L., & Ynalves, R. A. (2014). Antimicrobial Activity of Plant Secondary Metabolites: A Review. *Academic Journals Inc*, 8(5), 2014–2213. <https://doi.org/10.3923/rjamp.2014.2014.213>
- Daeli, I.O., & Ridho, R. (2023). Formulasi dan Uji Aktivitas Antibakteri Krim Ekstrak Daun Johar (*Cassia siamea* L.) terhadap *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Farmasi dan Farmakoinformatika*, 1(2), 88-103. <http://dx.doi.org/10.35760/jff.2023.v1i2.8967>
- de Brito, R. C., da Silva, G. N., Farias, T. C., Ferreira, P. B., & Ferreira, S. B. (2017). Standardization of the Safety Level of the Use of DMSO in Viability Assays in Bacterial Cells. *MOL2NET*, 1–6. <https://doi.org/10.3390/mol2net-03-04980>
- Ergina, S. N., & Pursitasari, I. D. (2014). Uji Kualitatif Senyawa Metabolit Sekunder pada Daun Palado (*Agave angustifolia*) yang Diekstraksi dengan Pelarut Air dan Etanol. *Jurnal Akademika Kimia*, 3(3), 165–172. <http://jurnal.untad.ac.id/jurnal/index.php/JAK/article/view/7797>
- Fahmi, I., Nurrokhman, & Mustafa, M. (2014). Pola Kepekaan *Staphylococcus Epidermidis* terhadap Beberapa Golongan Antibiotik di RSUD Dr. Soeradji Tirtonegoro Klaten Tahun 2012-2013. Skripsi, Universitas Gadjah Mada.
- Fitriah, Mappiratu, & Prismawiryanti. (2017). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Tanaman Johar (*Cassia siamea* Lamk.) dari Berbagai Tingkat Kepolaran Pelarut. *Kovalen*, 3(3), 242–251. <http://jurnal.untad.ac.id/jurnal/index.php/kovalen/article/view/9333>
- Ibrahim, H. A.-H. (2018). Introductory Chapter: Fractionation. *Intech Open*, 1–12. <https://doi.org/10.5772/intechopen.78050>
- Indriyani, T., & Wulandari, Y. (2015). IbM Pengolahan Daun Johar. *Seminar Nasional Sains Dan Teknologi Terapan III 2015*, 361–368. http://jurnal.itats.ac.id/wp-content/uploads/2015/10/11.-TUTUK2_IbM_edited.pdf
- Kamagate, M., Koffi, C., Kouame, N.M., Akoubet, A., Yao, N.A.R., & Die-Kakou, H.M. (2014). Ethnobotany, Phytochemistry, Pharmacology and Toxicology Profiles of *Cassia siamea* Lam. *The Journal of Phytopharmacology*, 3(1), 57-76. <https://phytopharmajournal.com/articles/details/436>
- Kumar, D., Jain, A., & Verma, A. (2017). Phytochemical and Pharmacological Investigation of *Cassia Siamea* Lamk: An Insight. *The Natural Products Journal*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.2174/2210315507666170509125800>
- Laksmi, R., & Hidayati. (2014). *Budidaya Johar (Cassia seamea) Untuk Antisipasi Kondisi Kering*. IPB Press, Bandung.
- Leber, A. L. (2016). *Clinical Microbiology Procedures Handbook, Volume 1-3, 4th Edition*. In *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. American Society for Microbiology.

<https://doi.org/10.1128/9781555818814.ch5.20.1>

- Liofilchem. (2005). Mannitol Salt Agar (MSA-D). Culture, 1–3.
- Mardiastuti, Sjatha, F., Kusumaningrum, A., & Rozaliyani, A. (2021). MIMS Mikrobiologi Medis. Edisi ke-6. Elsevier, Singapore.
- Marliana, S. D., Suryanti, V., & 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. <https://doi.org/10.13057/biofar/f030106>
- Munawaroh, R., Siswadi, Setyowati, E.P., Murwanti, R. & Hertiani, T. (2018). Korelasi Antara Kadar Flavonoid Total dan Aktivitas Fagositosis Makrofag Fraksi-Fraksi dari Ekstrak Etanol Kulit Batang Faloak (*Sterculia quadrifida* R. Br.) secara In Vitro. *Trad. Med. J.*, 23(1), 47-55. <https://doi.org/10.22146/mot.30882>
- Ningtyas, R. (2023). Teknik Dasar dalam Mikrobiologi. dalam Fadhila, F. Pengantar Mikrobiologi. Sada Kurnia Pustaka, Banten.
- Oyebade, K. F., Daspan, A. J., Denkok, Y., Alemika, T. E., & Ojerinde, O. S. (2021). Antimicrobial, Antioxidant, and Antiproliferative Properties of the Leaves of *Senna siamea*. *Journal of Complementary and Alternative Medical Research*, 14(1), 22–29. <https://doi.org/10.9734/JOCAMR/2021/v14i130235>
- Rubiyanto, D. (2017). Metode Kromatografi: Prinsip Dasar, Praktikum, dan Pendekatan Pembelajaran Kromatografi. Deepublish, Yogyakarta.
- Saifudin, A. (2014). Senyawa Alam Metabolit Sekunder. Deepublish, Yogyakarta.
- Sari, M., (2019). Gambaran Umum Infeksi Bakteri di Kulit, dalam Hidayati, A.N., Damayanti, Sari, M., Alinda, M.D., Reza, N.R., Anggraeni, S., & Widia, Y. *Seri Dermatologi dan Venerologi: Infeksi Bakteri di Kulit*. Airlangga University Press, Surabaya.
- Scalbert, A. (1991). Antimicrobial Properties of Tannins. *Phytochemistry*, 30(12), 3875–3883. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)83426-L](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)83426-L)
- Siadi, K. (2012). Ekstrak Bungkil Biji Jarak Pagar (*Jatropha curcas*) sebagai Biopestisida yang Efektif dengan Penambahan Larutan NaCl. *Jurnal MIPA Unnes*, 35(1), 77–83. <https://doi.org/10.15294/ijmns.v35i1.2099>
- Smith, A. C., & Hussey, M. A. (2005). Gram Stain Protocols. *American Society for Microbiology*, 1(September 2005), 14. <https://asm.org/getattachment/5c95a063-326b-4b2f-98ce-001de9a5ece3/gram-stain-protocol-2886.pdf>
- Spangenberg, B., Poole, C. F., & Weins, C. (2011). Quantitative Thin-layer Chromatography. In *Quantitative Thin-Layer Chromatography* (pp. 277–288). <https://doi.org/10.1007/978-3-642-10729-0>
- Suhendi, A., Hanwar, D., Santoso, B., Wicaksono, A.N., & Widiana, L. (2018). Antioxidant Activity of Non polar and Semipolar Fractions of Ethanol Extract of *Zingiber zerumbet* Smith Leaves by Spectrophotometer and ELISA Reader. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 10(3), 439-441.
- Wang, M., Zhang, Y., Wang, R., Wang, Z., Yang, B., & Kuang, H. (2021). An Evolving Technology That Integrates Classical Methods Chromatography Bioautography. *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*, 26, 1–21. <https://doi.org/10.3390/molecules26154647>

- Yan, Y., Li, X., Zhang, C., Lv, L., Gao, B., & Li, M. (2021). Research Progress on Antibacterial Activities and Mechanisms of Natural Alkaloids: A Review. *Antibiotics*, 10(318), 1–30. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10030318>
- Zada, A.A.S., & Febriawan, R. (2021). Perbedaan Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Metode Well Diffusion dan Kirby bauer Terhadap Pertumbuhan Bakteri. *Jurnal Medika Utama*, 2(04), 1156–1161. <https://jurnalmedikahutama.com/index.php/JMH/article/view/241>
- Zhou, X., & Li, Y. (2015). Supragingival Microbes. *Atlas of Oral Microbiology*, 41–65. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-802234-4.00003-3>