

AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI EKSTRAK ETANOL

DAUN PUTRI MALU (*Mimosa pudica*) TERHADAP

***Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA)**

SECARA IN VITRO

TUGAS AKHIR

Untuk Memenuhi Persyaratan

Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi



Oleh :

Nilna Jauharotul Kamelia

NIM. 145070500111005

PROGRAM STUDI FARMASI

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2018

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI EKSTRAK ETANOL DAUN PUTRI MALU
(*Mimosa pudica*) TERHADAP *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*
(MRSA) SECARA IN VITRO

Oleh:

Nilna Jauharotul Kamella

Telah diuji pada:

Hari : Senin

Tanggal : 9 April 2018

dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji-I

Ika Putri Nurhayati, S.Farm., M.Sc., Apt.

NIP. 2013048909152001

Penguji-IV Pembimbing-I,

Penguji-III Pembimbing-II

Dr. Dra. Sri Winarsih, Apt., M.Si.

NIP. 195408231981032001

Uswatun Khasanah, M.Farm., Apt.

NIP. 2011068512222001

Mengetahui,
Ketua Program Studi Sarjana Farmasi,

Dr. Dra. Sri Winarsih, Apt., M.Si.

NIP. 195408231981032001

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Nilna Jauharotul Kamelia

NIM : 145070500111005

Program Studi : Sarjana Farmasi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini benar-benar hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambil-alihan atau pikiran orang lain yang saya aku sebagai tulisan atau pikiran saya. Apabila di kemudian hari dapat dibuktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 12 April 2018

Yang membuat pernyataan

METERAI
TEMPEL

2268BAEF995412844

6000
ENAM RIBURUPIAH

(Nilna Jauharotul Kamelia)

NIM. 145070500111005

DAFTAR RIWAYAT HIDUP

Nama Lengkap : Nilna Jauharotul Kamelia
Tempat, Tanggal Lahir : Malang, 16 Mei 1997
Jenis Kelamin : Perempuan
Agama : Islam
Alamat Asal : Jalan Yuniur IV/416, RT 14, RW 09, Martopuro,
Purwosari, Kabupaten Pasuruan
No. Telpn : 081259678813
Email : nilna.kamelia@gmail.com
Motto Hidup : Tegas terhadap diri sendiri namun lembut terhadap orang lain

Riwayat Pendidikan Formal

(2001-2003)	TK PGRI II Purwosari
(2003-2009)	SD Negeri 1 Martopuro
(2009-2012)	SMP Negeri 1 Purwosari
(2012-2014)	SMA Negeri 1 Lawang (Accelerated Class)
(2014-Sekarang)	S1 Program Studi Farmasi FKUB Malang

Riwayat Bidang Organisasi

2015 Departemen Pengabdian dan Keilmiahan (PIL- HMF)
-- Himpunan Mahasiswa Farmasi (HMF)
2015 Anggota Lembaga Studi Ilmiah Mahasiswa (LSIM) FKUB
-- Lembaga Studi Ilmiah Mahasiswa (LSIM) FKUB

Pelatihan

2014 Latihan Kepemimpinan dan Manajemen Mahasiswa Farmasi (LKMMF) I
ISMAFARSI Jatim-Bali
2014 Latihan Kepemimpinan dan Manajemen Mahasiswa Farmasi (LKMMF) II
ISMAFARSI Jatim-Bali
2015 Latihan Kepemimpinan dan Manajemen Mahasiswa (LKMM) FKUB

Kepanitiaan

2015 Sekretaris Hi-Grade (HMF)

2015 Ketua Pelaksana Pharmacist Update (HMF)

2015 Bendahara Pharmacy Care (HMF)

2015 Staff Konsumsi Temu Akrab (Tekrab) (LSIM)

2015 Staff Konsumsi Medical Fiesta (Medfiest) (LSIM)

2015 Staff Humas Workshop PKM (LSIM)

2015 Fasil PKM-P MABA (LSIM)

Prestasi / Penghargaan (dari pemerintah, asosiasi atau instansi lainnya)

No.	Jenis Penghargaan	Institusi Pemberi Penghargaan	Tahun
1	Juara III Beregu Senam Kebugaran Jasmani Kabupaten Pasuruan	Dinas Pendidikan Kabupaten Pasuruan	2007
2	Juara III Tari Tradisional Kabupaten Pasuruan	Dinas Pendidikan Kabupaten Pasuruan	2007
3	Juara II Siswa Berprestasi Putri Kabupaten Pasuruan	Dinas Pendidikan Kabupaten Pasuruan	2008
4	Juara III Olimpiade Sains Nasional Kategori IPA Kabupaten Pasuruan	Dinas Pendidikan Kabupaten Pasuruan	2008
5	Finalis International Mathematics Science Olimpiade (IMSO)	Dinas Pendidikan Jawa Timur	2008
6	Juara 1 Lomba Cerdas Cermat Bela Negara Hari Pahlawan	SMP Negeri 1 Purwosari	2010
7	Juara III Olimpiade Sains Nasional Kategori IPS Kabupaten Pasuruan	Dinas Pendidikan Kabupaten Pasuruan	2011

8	Juara III Osis Awards Kabupaten, Kategori Siswa Eksternal -Pemrograman Komputer	SMK Negeri 1 Purwosari	2012
9	Juara I Game For Smart Tingkat Kabupaten	PT. Alfasoft	2012
10	Juara I Game For Smart Tingkat Jawa Timur	PT. Alfasoft	2012
11	Juara III Olimpiade Speedy Cerdas Tingkat Jawa Timur	PT. Telkom Indonesia	2012
12	Finalis Olimpiade Speedy Cerdas Tingkat Nasional	PT. Telkom Indonesia	2012
13	Juara II Loka PKM MABA FKUB (PKM-P)	Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya	2014
14	Juara Favorit Loka PKM MABA FKUB (PKM-P)	Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya	2014
15	Finalis Rektor Cup Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	2015
16	Nominator MAP Bidang Ilmiah	Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya	2015

Karya Tulis Ilmiah

2014

PKM-P

WPF "TRANSDERPAFE" (Waterproof Transdermal Patch for Flatulence) Formulasi Plester Kulit Transdermal Dengan Bahan Aktif Berupa Ekstrak Daun Sambiloto (*Andrographis paniculata*) Sebagai Media Alternatif Penghilang Gejala Flatulen Pada Masyarakat

2014

PKM-K

"JAKUTAKU WATER PROOF BREATHABLE, WEATHER PROOF AND WINDBREAKER" Pengembangan Inovasi Usaha Jaket Multifungsi "Three in One" Berbahan Dasar Kain *Taslan dan Cardora* melalui Inovasi Pemasaran Berbasis *Online dan Delivery Order* Didukung Dengan Design dan Kemasan yang Informatif dan Inovatif)

2014

PKM-K

"BOBOSU GLOW IN THE DARK" Pengembangan Inovasi Usaha Botol Susu Three in One Anak Yang Dapat Menyala di Kegelapan Dibalut Dengan Boneka Multifungsi Yang Dapat Memberikan Efek Terapi Ketenangan Bagi Anak melalui Inovasi Pemasaran Berbasis *Online dan Delivery Order*

2015

PKM-GT

Inovasi Plester Kulit Transdermal Sebagai Media Alternatif Penghilang Gejala Flatulen Pada Masyarakat Dengan Memanfaatkan Ekstrak Daun Sambiloto (*Andrographis paniculata*)

2015

PKM-GT

Inovasi "KHS : Kanopi Hijau Sehat" Sebagai Media Pembelajaran, Media Publikasi, dan Alternatif Untuk Meningkatkan Ruang Terbuka Hijau Serta Menambah Jumlah Pejalan Kaki di Kota Malang

2014

PKM-K

" NE-PHARMAKIBO" ; Neo Pharmacy Kit Box (Inovasi Kit Box Farmasi Tiga Lapis dengan Desain Modern, dan Inovatif, melalui Strategi Pemasaran Terkonsentrasi (Concentrated Marketing) Bersistem Online Pre-order)

KATA PENGANTAR

Segala puji hanya bagi Allah SWT Tuhan Yang Maha Esa yang telah memberikan petunjuk dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan Tugas Akhir dengan judul “Aktivitas Antibakteri Fraksi Ekstrak Etanol Daun Putri Malu (*Mimosa pudica*) terhadap *Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus* (MRSA) secara In Vitro”.

Dengan selesainya Tugas Akhir ini, penulis mengucapkan terima kasih yang tak terhingga kepada :

1. Kedua orang tua tercinta, Bapak Abdul Sukur dan Ibu Siti Fauzah serta kakak-kakak tersayang yang senantiasa memberikan doa, dukungan, kasih sayang, pengertian, dan kepercayaan kepada penulis.
2. Dr. Dra. Sri Winarsih, M.Si., Apt., sebagai ketua Program Studi Sarjana Farmasi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dan selaku dosen pembimbing pertama yang telah memberikan banyak bantuan serta saran dalam proses penelitian, yang dengan sabar membimbing, dan senantiasa memberi semangat, sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir ini.
3. Uswatun Khasanah, S.Farm., M.Farm., Apt., sebagai pembimbing kedua yang dengan sabar dalam membimbing jalannya penelitian, memberi banyak masukan dalam penulisan, dan senantiasa memberi dukungan, sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir ini.
4. Ika Putri Nurhayati, S.Farm., M.Sc., Apt., sebagai penguji Tugas Akhir yang telah memberikan pertanyaan dan masukan yang membangun untuk menyempurnakan naskah Tugas Akhir.

5. Dr. Dr. Sri Andarini, M.Kes., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

6. Seluruh dosen beserta civitas akademika PSSF FKUB Segenap anggota Tim Pengelola Tugas Akhir FKUB.

7. Analis dan Petugas Laboratorium Farmasi FKUB, Mbak Septi, Pak Atmari, dan Bu Tri.

8. Analis dan petugas Laboratorium Mikrobiologi FKUB, Pak Slamet, dan Pak Ali.

9. Teman seperjuangan dalam menyelesaikan Tugas Akhir, Adistya Alfatikha Rahma yang telah berjuang bersama dalam melaksanakan amanah penelitian.

10. Sahabat-sahabat yang telah memberikan banyak bantuan dan semangat dalam menyelesaikan Tugas Akhir, Azizah, Hillyah, Nabillah, Siska, Meita, Yusmita, Nadia, Jihan, Kevin, Roihan.

11. Teman-teman Farmasi 2014, yang telah berjuang bersama dalam perkuliahan, terimakasih atas segala pengertian, bantuan, doa, dan dukungan selama penulis menyelesaikan Tugas Akhir ini.

12. Semua pihak yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan Tugas Akhir ini yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis menyadari bahwa karya ilmiah ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu, penulis membuka diri untuk segala saran dan kritik yang membangun.

Akhir kata, semoga Tugas Akhir ini dapat bermanfaat bagi yang membutuhkan.

Malang, 12 April 2018

Penulis

ABSTRAK

Kamelia, Nilna Jauharotul. 2018. **Aktivitas Antibakteri Fraksi Ekstrak Etanol Daun Putri Malu (*Mimosa pudica*) terhadap *Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA)* secara *In Vitro***. Tugas Akhir, Jurusan Farmasi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Dr. Dra. Sri Winarsih, MSi., Apt (2) Uswatun Khasanah, S.Farm., M.Farm., Apt.

Putri malu (*Mimosa pudica*) merupakan herba dari famili Fabaceae. Pemanfaatan herbal sebagai antibakteri merupakan salah satu upaya untuk menurunkan angka resistensi. Penelitian pendahuluan mengenai aktivitas antibakteri dari *M. pudica* masih terbatas pada ekstrak dimana senyawa didalamnya masih sangat kompleks, sehingga perlu dilakukan pemisahan senyawa berdasarkan polaritas melalui proses fraksinasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari fraksi ekstrak etanol daun putri malu terhadap *Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus* serta mengetahui profil metabolitnya. Fraksi ekstrak etanol daun putri malu didapatkan dari proses fraksinasi bertingkat menggunakan pelarut n-heksan, etil asetat, n-butanol, dan air. Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi cakram dengan tiga kali pengulangan pada berbagai dosis, meliputi 3 mg, 6 mg, 9 mg, 12 mg, dan 15 mg. Pengujian KLT-bioautografi dilakukan untuk mengetahui senyawa apa yang memiliki aktivitas antibakteri. Analisis statistik non parametrik friedman menunjukkan nilai $p < 0,05$ sehingga varian dosis dan jenis sampel dinyatakan memiliki pengaruh terhadap aktivitas antibakteri. Hasil pengujian *post hoc* wilcoxon menunjukkan nilai $p > 0,05$ sehingga hubungan varian dosis dan jenis sampel terhadap aktivitas antibakteri tidak berbeda signifikan. Kesimpulan penelitian ini adalah fraksi ekstrak etanol daun putri malu memiliki aktivitas antibakteri terhadap *MRSA* dengan profil metabolit yang berbeda, senyawa metabolit yang memiliki aktivitas adalah flavonoid, saponin, alkaloid, tanin, dan klorofil, aktivitas antibakteri fraksi meningkat seiring peningkatan dosis uji, fraksi etil asetat merupakan fraksi yang memiliki aktivitas hambatan terbesar terhadap *MRSA*, aktivitas antibakteri dari seluruh sampel uji dengan dosis 3 mg, 6 mg, 9 mg, 12 mg, dan 15 mg diketahui sebanding dengan antibiotik vankomisin 30 μ g.

Kata Kunci: antibakteri, KLT-bioautografi, *Mimosa pudica*, *MRSA*, putri malu.

ABSTRACT

Kamelia, Nilna Jauharotul. 2018. **In Vitro Antibacterial Activity of Ethanolic Extract Fraction of Putri Malu (*Mimosa pudica*) Leaves against Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)**. Final Assignment, Departement of Pharmacy, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisors: (1) Dr. Dra. Sri Winarsih, MSi., Apt (2) Uswatun Khasanah, S.Farm., M.Farm., Apt.

Putri malu (*Mimosa pudica*) is a herb from the family Fabaceae. Utilization of herbs as an antibacterial is one of the efforts to reduce the number of resistances. Preliminary research on the antibacterial activity of *M. pudica* is still limited to the extract form in which the compound inside is still complex, so it is necessary to separate the compounds based on polarity by fractionation process. The aim of this study was to find out the antibacterial activity of ethanolic extract fraction of *M. pudica* leaves against *Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus* (MRSA) and to know the metabolite profile. The fraction was obtained from a multilevel fractionation process using n-hexane, ethyl acetate, n-butanol, and water solvents. Antibacterial activity test of the fraction was performed by disc diffusion method with three repetitions at various doses, including 3 mg, 6 mg, 9 mg, 12 mg, and 15 mg. TLC-bioautography test were conducted to determine which compounds had antibacterial activity. Statistical analysis of nonparametric friedman showed p value <0,05 so that variant of doses and type of sample expressed to have an effect on antibacterial activity. The result of post hoc wilcoxon test showed p> 0,05 so that the correlation of variance of concentration and type of sample to antibacterial activity did not different significantly. The conclusion of this study is the fraction of ethanolic extract of putri malu leaves have antibacterial activity against MRSA with different metabolite profiles, secondary metabolites that have activity are flavonoids, saponins, alkaloids, tannins, and chlorophyll, antibacterial activity of the fraction increases with increasing doses, ethyl acetate is a fraction that has the greatest antibacterial activity to MRSA, antibacterial activity of all test samples with doses of 3 mg, 6 mg, 9 mg, 12 mg, and 15 mg is known to be comparable with vancomycin antibiotics 30 µg.

Keywords: antibacterial, MRSA, putri malu, *Mimosa pudica*, TLC-bioautography.

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
IDENTITAS TIM PENGUJI	iii
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	iii
DAFTAR RIWAYAT HIDUP	iv
KATA PENGANTAR	x
ABSTRAK (BAHASA INDONESIA)	x
ABSTRAK (BAHASA INGGRIS)	xi
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	5
1.3 Tujuan Penelitian.....	6
1.3.1 Tujuan Umum.....	6
1.3.2 Tujuan Khusus.....	6
1.4 Manfaat Penelitian.....	7
1.4.1 Manfaat Akademik.....	7
1.4.1 Manfaat Praktis.....	7
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1 Tinjauan Tanaman <i>Mimosa pudica</i>	8
2.1.1 Deskripsi.....	8
2.1.2 Klasifikasi.....	9
2.1.3 Sinonim.....	9
2.1.4 Morfologi dan Karakteristik <i>Mimosa pudica</i>	10
2.1.5 Habitat dan Persebaran.....	11
2.1.6 Kandungan Kimia.....	11
2.1.7 Kegunaan dalam pengobatan Tradisional.....	15
2.1.8 Aktivitas Farmakologis.....	15
2.1.9 Aktivitas Antibakteri Ekstrak <i>Mimosa pudica</i>	18
2.1.10 Aktivitas Antibakteri dari Fraksi <i>Mimosa pudica</i>	19
2.2 <i>Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA)</i>	19

2.2.1	Klasifikasi.....	19
2.2.2	Deskripsi.....	20
2.2.3	Morfologi <i>MRSA</i>	20
2.2.4	Patogenisitas <i>MRSA</i>	23
2.2.5	Pembenihan.....	25
2.2.6	Temuan Klinis.....	25
2.2.7	Antibakteri.....	25
2.2.8	Reistensi <i>MRSA</i>	26
2.2.9	Mekanisme Resistensi <i>MRSA</i> terhadap Antibakteri.....	28
2.2.10	Uji Kepekaan Antibakteri secara <i>In vitro</i>	29
2.3	Ekstraksi.....	32
2.3.1	Jenis Ekstraksi.....	33
2.3.2	Metode Ekstraksi.....	33
2.3.3	Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Hasil Ekstraksi.....	36
2.4	Fraksinasi.....	38
2.4.1	Partisi Cair-Cair.....	38
2.4.2	Kromatografi.....	38
2.4.2.1	Kromatografi Lapis Tipis.....	39
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN.....		41
3.1	Kerangka Konsep Penelitian.....	41
3.2	Hipotesis Penelitian.....	44
BAB 4 METODE PENELITIAN.....		43
4.1	Rancangan Penelitian.....	43
4.2	Sample Penelitian.....	43
4.3	Jumlah Pengulangan.....	43
4.4	Variabel Penelitian.....	46
4.4.1	Variabel Bebas (Independent).....	46
4.4.2	Variabel Tergantung (Dependent).....	47
4.4.3	Variabel Kontrol.....	47
4.5	Tempat dan Waktu Penelitian.....	47
4.6	Alat dan Bahan Penelitian.....	47
4.6.1	Pembuatan Ekstrak Etanol 96% Daun Putri Malu.....	47
4.6.2	Pembuatan Fraksi Ekstrak Etanol Daun Putri Malu.....	48
4.6.3	Optimasi dan Identifikasi Profil Metabolit dengan KLT.....	48
4.6.4	Sterilisasi Alat dan Bahan.....	49
4.6.5	Pembuatan Suspensi Bakteri <i>MRSA</i>	49

4.6.6	Identifikasi Bakteri <i>MRSA</i>	49
4.6.7	Pembuatan Larutan Uji.....	50
4.6.8	Pembuatan Cakram Uji.....	50
4.6.9	Penentuan Zona Hambat menggunakan Difusi Cakram.....	50
4.6.10	Pengamatan dan Pengukuran.....	50
4.6.11	Bioautografi.....	51
4.7	Definisi Operasional.....	51
4.8	Prosedur Penelitian.....	53
4.8.1	Pembuatan Ekstrak Etanol 96% Daun Putri Malu.....	53
4.8.1.1	Proses Ekstraksi.....	53
4.8.1.2	Proses Evaporasi.....	54
4.8.2	Proses Fraksinasi Cair-Cair.....	54
4.8.3	Optimasi dan Identifikasi profil metabolit dengan KLT.....	55
4.8.4	Sterilisasi Alat dan Bahan.....	56
4.8.5	Pembuatan Suspensi Bakteri <i>MRSA</i>	56
4.8.6	Identifikasi Bakteri <i>MRSA</i>	58
4.8.6.1	Pewarnaan Gram.....	58
4.8.6.2	Uji Koagulase.....	59
4.8.6.3	Uji Katalase.....	59
4.8.6.4	Identifikasi Bakteri dengan Media MSA (<i>Mannitol Salt Agar</i>).....	60
4.8.6.5	Identifikasi Bakteri dan Uji Sensitivitas dengan Metode VITEK.....	60
4.8.7	Pembuatan Larutan Uji.....	61
4.8.8	Pembuatan Cakram Uji.....	62
4.8.9	Penentuan Zona Hambat dengan Metode Difusi Cakram.....	63
4.8.10	Pengamatan dan Pengukuran.....	63
4.8.11	Bioautografi.....	63
4.9	Analisis Data.....	65
4.10	Alur Penelitian.....	66
BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA.....		68
5.1	Ekstraksi.....	68
5.2	Fraksinasi.....	68
5.3	Optimasi Fase Gerak KLT.....	69
5.4	Optimasi Konsentrasi dengan Metode Difusi Cakram.....	70
5.5	Uji Aktivitas Antibakteri pada <i>MRSA</i> dengan Metode Difusi Cakram.....	71
5.6	Uji KLT-Bioautografi.....	72
5.7	Analisis Data.....	76

BAB 6 PEMBAHASAN	78
6.1 Ekstraksi dan Fraksinasi	78
6.3 Optimasi Fase Gerak KLT	83
6.4 Optimasi Konsentrasi dengan Metode Difusi Cakram	88
6.5 Uji Aktivitas Antibakteri pada <i>MRSA</i> dengan Metode Difusi Cakram	90
6.6 Uji KLT-Bioautografi	94
6.7 Implikasi terhadap Bidang Kefarmasian	98
BAB 7 PENUTUP	99
7.1 Kesimpulan	99
7.2 Saran	100
DAFTAR PUSTAKA	101



DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 2.1 Beberapa Kandungan Kimia <i>Mimosa pudica</i> Strukturnya.....	14
Tabel 2.2 Faktor Virulensi MRSA dan Karakteristiknya.....	24
Tabel 2.3 Deret Eluotropi Pelarut.....	37
Tabel 2.4 Interpretasi Senyawa Metabolit dari KLT.....	40
Tabel 5.1 Proses Fraksinasi dan Massa Fraksi Kental.....	68
Tabel 5.2 Fase Gerak Hasil Optimasi untuk Ekstrak Etanol Daun Putri Malu (<i>Mimosa pudica</i>) dan Fraksinya	69
Tabel 5.3 Diameter Zona Hambat Ekstrak Etanol Daun Putri Malu pada Optimasi Konsentrasi Uji menggunakan Metode Difusi Cakram (mm).....	70
Tabel 5.4 Diameter Zona Hambat Ekstrak Etanol Daun Putri Malu dan Fraksinya menggunakan Metode Difusi Cakram (mm).....	71
Tabel 5.5 Rf Spot Hasil KLT Bioautografi pada Bakteri <i>MRSA</i>	76

DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar 2.1 <i>Mimosa pudica</i>	8
Gambar 2.2 Morfologi <i>Mimosa pudica</i>	10
Gambar 2.3 Struktur <i>Staphylococcus aureus</i>	21
Gambar 2.4 <i>Staphylococcus aureus</i> dan MRSA pada Columbia agar dengan darah domba defibrinated 5% (Bio-Rad™).....	21
Gambar 2.5 Faktor Virulensi dan Mutasi Genetik pada MRSA.....	23
Gambar 3.1 Kerangka Konsep.....	41
Gambar 4.1 Alur Penelitian.....	66
Gambar 5.1 Gambar Uji KLT-Bioautografi Sampel Ekstrak Etanol 96%.....	72
Gambar 5.2 Gambar Uji KLT-Bioautografi Sampel Fraksi N-Heksan.....	73
Gambar 5.3 Gambar Uji KLT-Bioautografi Sampel Fraksi Etil Asetat.....	74
Gambar 5.4 Gambar Uji KLT-Bioautografi Sampel Fraksi N-Butanol.....	74
Gambar 5.5 Gambar Uji KLT-Bioautografi Sampel Fraksi Air.....	75
Gambar 5.6 Pengaruh Serial Konsentrasi pada Ekstrak Etanol Daun Putri Malu dan Fraksinya terhadap Diameter Zona Hambat.....	77

DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

Lampiran 1 Sertifikat Determinasi Tanaman Putri Malu (<i>Mimosa pudica</i>).....	111
Lampiran 2 Proses Ekstraksi dan Perhitungan Rendamen.....	112
Lampiran 3 Proses Fraksinasi	113
Lampiran 4 Pengenceran Bertingkat Sampel Ekstrak Etanol Daun Putri Malu (<i>Mimosa pudica</i>) dan Fraksinya.....	115
Lampiran 5 Fase Gerak yang digunakan pada Optimasi Fase Gerak	116
Lampiran 6 Hasil Optimasi Fase Gerak Ekstrak Etanol Daun Putri Malu (<i>Mimosa pudica</i>) dan Fraksinya menggunakan KLT.....	117
Lampiran 7 Identifikasi Bakteri <i>Methicillin Resistant Staphylococcus aureus</i>	131
Lampiran 8 Penentuan Volume yang Dibutuhkan dalam Pembuatan Suspensi Bakteri.....	135
Lampiran 9 Penimbangan Sampel.....	136
Lampiran 10 Perhitungan Dosis Sampel Ekstrak Etanol Daun Putri Malu (<i>Mimosa pudica</i>) dan Fraksinya.....	137
Lampiran 11 Hasil Optimasi Konsentrasi Uji menggunakan Metode Difusi Cakram Penimbangan Sampel.....	138
Lampiran 12 Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Putri Malu (<i>Mimosa pudica</i>) dan Fraksinya menggunakan Metode Difusi Cakram.....	139
Lampiran 13 Alat yang Digunakan dalam Penelitian	144
Lampiran 14 Analisa Statistika	149

ABSTRAK

Kamelia, Nilna Jauharotul. 2018. **Aktivitas Antibakteri Fraksi Ekstrak Etanol Daun Putri Malu (*Mimosa pudica*) terhadap *Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA)* secara *In Vitro***. Tugas Akhir, Jurusan Farmasi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Dr. Dra. Sri Winarsih, MSi., Apt (2) Uswatun Khasanah, S.Farm., M.Farm., Apt.

Putri malu (*Mimosa pudica*) merupakan herba dari famili Fabaceae. Pemanfaatan herbal sebagai antibakteri merupakan salah satu upaya untuk menurunkan angka resistensi. Penelitian pendahuluan mengenai aktivitas antibakteri dari *M. pudica* masih terbatas pada ekstrak dimana senyawa didalamnya masih sangat kompleks, sehingga perlu dilakukan pemisahan senyawa berdasarkan polaritas melalui proses fraksinasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari fraksi ekstrak etanol daun putri malu terhadap *Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus* serta mengetahui profil metabolitnya. Fraksi ekstrak etanol daun putri malu didapatkan dari proses fraksinasi bertingkat menggunakan pelarut n-heksan, etil asetat, n-butanol, dan air. Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi cakram dengan tiga kali pengulangan pada berbagai dosis, meliputi 3 mg, 6 mg, 9 mg, 12 mg, dan 15 mg. Pengujian KLT-bioautografi dilakukan untuk mengetahui senyawa apa yang memiliki aktivitas antibakteri. Analisis statistik non parametrik friedman menunjukkan nilai $p < 0,05$ sehingga varian dosis dan jenis sampel memiliki pengaruh terhadap aktivitas antibakteri. Hasil pengujian *post hoc* wilcoxon menunjukkan nilai $p > 0,05$ sehingga hubungan varian dosis dan jenis sampel terhadap aktivitas antibakteri tidak berbeda signifikan. Kesimpulan penelitian ini adalah fraksi ekstrak etanol daun putri malu memiliki aktivitas antibakteri terhadap *MRSA* dengan profil metabolit yang berbeda, senyawa metabolit yang memiliki aktivitas adalah flavonoid, saponin, alkaloid, tanin, dan klorofil, aktivitas antibakteri fraksi meningkat seiring peningkatan dosis uji, fraksi etil asetat merupakan fraksi yang memiliki aktivitas hambatan terbesar terhadap *MRSA*, aktivitas antibakteri dari seluruh sampel uji dengan dosis 3 mg, 6 mg, 9 mg, 12 mg, dan 15 mg diketahui sebanding dengan antibiotik vankomisin 30 μ g.

Kata Kunci: antibakteri, KLT-bioautografi, *Mimosa pudica*, *MRSA*, putri malu.

ABSTRACT

Kamelia, Nilna Jauharotul. 2018. **In Vitro Antibacterial Activity of Ethanolic Extract Fraction of Putri Malu (*Mimosa pudica*) Leaves against Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)**. Final Assignment, Departement of Pharmacy, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisors: (1) Dr. Dra. Sri Winarsih, MSi., Apt (2) Uswatun Khasanah, S.Farm., M.Farm., Apt.

Putri malu (*Mimosa pudica*) is a herb from the family Fabaceae. Utilization of herbs as an antibacterial is one of the efforts to reduce the number of resistances. Preliminary research on the antibacterial activity of *M. pudica* is still limited to the extract form in which the compound inside is still complex, so it is necessary to separate the compounds based on polarity by fractionation process. The aim of this study was to find out the antibacterial activity of ethanolic extract fraction of *M. pudica* leaves against *Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus* (MRSA) and to know the metabolite profile. The fraction was obtained from a multilevel fractionation process using n-hexane, ethyl acetate, n-butanol, and water solvents. Antibacterial activity test of the fraction was performed by disc diffusion method with three repetitions at various doses including 3 mg, 6 mg, 9 mg, 12 mg, and 15 mg. TLC-bioautography test were conducted to determine which compounds had antibacterial activity. Statistical analysis of nonparametric friedman showed p value <0,05 so that variant of doses and type of sample expressed to have an effect on antibacterial activity. The result of post hoc wilcoxon test showed p > 0,05 so that the correlation of variance of concentration and type of sample to antibacterial activity did not different significantly. The conclusion of this study is the fraction of ethanolic extract of putri malu leaves have antibacterial activity against MRSA with different metabolite profiles, secondary metabolites that have activity are flavonoids, saponins, alkaloids, tannins, and chlorophyll, antibacterial activity of the fraction increases with increasing doses, ethyl acetate is a fraction that has the greatest antibacterial activity to MRSA, antibacterial activity of all test samples with doses of 3 mg, 6 mg, 9 mg, 12 mg, and 15 mg is known to be comparable with vancomycin antibiotics 30 µg.

Keywords: antibacterial, MRSA, putri malu, *Mimosa pudica*, TLC-bioautography.

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) merupakan salah satu strain dari bakteri *Staphylococcus aureus*, yang merupakan bakteri Gram positif dan bersifat patogen oportunistik. Bakteri ini mampu hidup secara aerob dan fakultatif anaerob. Bakteri *MRSA* dapat menyebabkan infeksi berat pada manusia dalam berbagai kasus seperti infeksi kulit, asbes, bakteremia, endokarditis, pneumonia, sepsis, dll (Gnanamani *et al.*, 2017). Infeksi akibat bakteri ini sering mengakibatkan morbiditas dan mortalitas yang cukup signifikan. Umumnya *MRSA* sering ditemukan sebagai penyebab infeksi, seperti infeksi nosokomial di rumah sakit hingga infeksi pada komunitas (Gnanamani *et al.*, 2017).

Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) ditemukan pertama kali pada tahun 1961. Munculnya strain *MRSA* dilaporkan mengakibatkan angka kematian dan morbiditas yang cukup signifikan (Chen, 2014). Asia merupakan salah satu regio dengan presentase kasus infeksi *MRSA* tertinggi, baik yang berasal dari komunitas ataupun rumah sakit. Menurut penelitian Chen (2014), pada awal tahun 2010, diperkirakan prevalensi kasus *MRSA* di rumah sakit Hongkong dan Indonesia sebesar 28%. Sedangkan prevalensi untuk kasus infeksi *MRSA* komunitas di Asia berkisar 5-35%. Menurut Sulistyaniingsih (2010), prevalensi infeksi *MRSA* secara keseluruhan di Asia kini mencapai 70%, sementara di Indonesia pada tahun 2006 prevalensinya mencapai angka 23,5%.

Pencegahan infeksi akibat *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) saat ini sedang menjadi masalah karena tingginya kasus resistensi terhadap beberapa kelas antibiotik. Meningkatnya kasus resistensi MRSA terhadap antibiotik, diduga disebabkan akibat pemberian antibiotik yang berlebihan, sehingga memicu perubahan genetika dari bakteri. Bakteri MRSA dilaporkan menunjukkan resistensi terhadap antibiotika isoxazolyl penicillin seperti methicillin, oxacillin dan flucloxacillin, dan beberapa antibiotika betalaktam, makrolida, aminoglikosida, tetrasiklin, kloramfenikol, dan kuinolon (Gnanamani *et al.*, 2017). Hasil penelitian Udobi *et al.* (2013), melaporkan jika bakteri MRSA menunjukkan tingkat resistensi terhadap ampisilin dengan presentase sebesar 100%, pefloxacin dengan presentase rata-rata sebesar 76,6%, ceftriaxone dengan presentase rata-rata sebesar 70,9%, gentamisin dengan presentase rata-rata sebesar 48,26%, dan ciprofloxacin dengan presentase rata-rata sebesar 44,7 %.

Saat ini pengobatan satu-satunya yang dirasa efektif untuk mengobati infeksi *Methicillin Resisten Staphylococcus aureus* (MRSA) dapat dilakukan dengan pemberian antibiotika vankomisin (Harris *et al.*, 2017). Vankomisin adalah antibiotik glikopeptida golongan aminoglikosida yang bekerja dengan mekanisme menghambat sintesis dinding sel, mengubah permeabilitas membran sel, dan menghambat sintesis RNA bakteri gram positif (BPOM, 2017).

Banyaknya resistensi antibiotik terhadap bakteri membuat WHO meluncurkan suatu strategi yang disebut *Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance*. *Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance* merupakan strategi yang dikeluarkan oleh organisasi kesehatan dunia (WHO) sebagai upaya untuk mengatasi resistensi antimikroba. Strategi tersebut ditujukan kepada setiap negara untuk dapat berperan aktif dalam mencegah

meluasnya resistensi antibiotik (WHO, 2001). Untuk memecahkan permasalahan tersebut perlu dicari alternatif untuk memanfaatkan kembali bahan alam bagi kesehatan, khususnya dalam kasus pengendalian resistensi bakteri, karena tanaman obat tersedia secara melimpah di Indonesia.

Salah satu tanaman obat yang dapat dimanfaatkan ialah putri malu (*Mimosa pudica*) yang banyak ditemukan di Indonesia. *Mimosa pudica* adalah herba yang digolongkan kedalam famili Fabaceae, tanaman ini tumbuh secara liar, serta dapat dengan mudah ditemukan tumbuh secara liar di Brazil dan Benua Asia (Gurung, 2002). Menurut sistem pengobatan Ayurveda dan Yunani, *Mimosa pudica* cukup efektif digunakan sebagai pengobatan beberapa jenis penyakit yang dikenal akibat infeksi bakteri (Abirami *et al.*, 2014). Adanya pemanfaatan *Mimosa pudica* sebagai pengobatan antibakteri secara tradisional pada sistem pengobatan Ayurveda dan Yunani menyebabkan terdapat peningkatan penelitian mengenai aktivitas *Mimosa pudica* sebagai antibakteri terutama pada beberapa jenis bakteri yang sudah banyak mengalami resistensi seperti *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Thypii*, *Klebsiella pneumoniae*, hingga *Escherichia coli*.

Hasil uji antibakteri ekstrak metanol dari *Mimosa pudica* menunjukkan bahwa tanaman tersebut memiliki aktivitas antibakteri terhadap mikroorganisme yang diuji (Gandhiraja *et al.*, 2009). Tamilarasi dan Ananthi, (2012) menjelaskan bahwa ekstrak etanol daun *Mimosa pudica* memiliki aktivitas antibakteri pada beberapa bakteri patogen dan jamur. Menurut penelitian pendahuluan yang dilakukan oleh Sari dkk. (2015) menyebutkan bahwa ekstrak kasar dari *Mimosa pudica* memiliki efek antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan MRSA. Analisis fitokimia ekstrak mengungkapkan bahwa aktivitas antibakteri dari

bahan tanaman adalah karena adanya konstituen aktif seperti saponin, flavonoid dan fenol (Sahariah *et al.*, 2016). Menurut Palwinder *et al* (2011) konstituen aktif

Mimosa pudica perlu dipelajari lebih lanjut untuk selanjutnya diuji aktivitas antibakterinya. Hal tersebut didasarkan pada hasil studi pendahuluan yang telah dilakukan oleh Radjendran (2010), meunjukkan bahwa ekstrak metanol *Mimosa pudica* memiliki aktivitas antibakteri terhadap beberapa jenis bakteri.

Penggunaan *Mimosa pudica* dalam bentuk ekstrak untuk di kembangkan sebagai sediaan antibakteri tampaknya masih sulit untuk dilakukan. Hal tersebut dikarenakan dalam bentuk ekstrak, profil metabolit *M. pudica* masih terlalu banyak sehingga sulit untuk diamati aktivitas antibakteri dari tiap senyawa metabolit (Graham dan Rickwood, 1997). Berdasarkan penelitian yang ada, sebagian besar hanya mengungkapkan potensi *Mimosa pudica* sebagai antibakteri. Kandungan senyawa utama dalam *Mimosa pudica* yang berperan sebagai aktivitas antibakteri belum diteliti lebih lanjut. Untuk itu perlu dilakukan suatu prosedur pemisahan kandungan metabolit *Mimosa pudica* berdasar karakteristiknya melalui metode fraksinasi, dan kromatografi.

Penelitian ini merupakan bagian dari penelitian mengenai aktivitas antibakteri dari fraksi etanol daun putri malu yang dilakukan pada bakteri ESBL *E.coli* dan *MRSA*. Saat ini penelitian mengenai fraksi *Mimosa pudica* yang diuji sebagai antibakteri masih sangat terbatas. Penelitian mengenai *M. pudica* di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya juga masih terbatas pada bentuk ekstrak. Salah satu penelitian pendahuluan yang dilakukan Rajendran dan Sundarajan (2010) menunjukkan bahwa fraksi metanol dari daun *Mimosa pudica* yang diperoleh dari daerah Thailavaram India, diketahui memiliki aktivitas sebagai antibakteri pada beberapa bakteri Gram negatif, Gram positif, dan jamur yang

digunakan sebagai sampel penelitian. Penggunaan metanol sebagai pelarut pada studi pendahuluan yang dilakukan Radjendran (2010) diketahui memiliki efek toksik apabila dikembangkan sebagai suatu sediaan jika dibandingkan dengan pelarut etanol. Saat ini belum ada penelitian lebih lanjut mengenai fraksi etanol daun *Mimosa pudica* sebagai antibakteri yang berasal dari Indonesia (khususnya kota Batu, Malang), sehingga diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai fraksi *Mimosa pudica* yang berasal dari Batu, Malang, agar dapat diketahui aktivitasnya sebagai antibakteri serta senyawa golongan apa pada daun *Mimosa pudica* yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Methicillin Resisten Staphylococcus aureus*, sehingga diharapkan penelitian ini dapat menjadi dasar dalam pengembangan sediaan antibakteri untuk mengatasi infeksi akibat *Methicillin Resisten Staphylococcus aureus*.

1.2 Rumusan Masalah

1.2.1 Apakah ekstrak etanol daun putri malu (*Mimosa pudica*) dan fraksinya (fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, fraksi n-butanol, dan fraksi air) memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* secara *in vitro*?

1.2.2 Bagaimana profil senyawa metabolit hasil KLT dari ekstrak etanol daun putri malu (*Mimosa pudica*) dan fraksinya (fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, fraksi n-butanol, dan fraksi air)?

1.2.3 Senyawa metabolit apa dari ekstrak etanol daun putri malu (*Mimosa pudica*) dan fraksinya (fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, fraksi n-butanol, dan fraksi air) yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* secara *in vitro*?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

1.3.1.1 Mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun putri malu (*Mimosa pudica*) dan fraksinya (fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, fraksi n-butanol, dan fraksi air) terhadap *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* secara *in vitro*.

1.3.1.2 Mengetahui profil metabolit hasil KLT ekstrak etanol daun putri malu (*Mimosa pudica*) dan fraksinya (fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, fraksi n-butanol, dan fraksi air).

1.3.2 Mengetahui senyawa metabolit apa yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* secara *in vitro*.

1.3.3 Tujuan Khusus

1.3.3.1 Mengukur diameter zona hambat ekstrak etanol daun putri malu (*Mimosa pudica*) dan fraksinya (fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, fraksi n-butanol, dan fraksi air) dibandingkan dengan vankomisin pada *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* secara *in vitro*.

1.3.3.2 Menganalisa pengaruh pemberian dosis ekstrak etanol daun putri malu (*Mimosa pudica*) dan fraksinya (fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, fraksi n-butanol, dan fraksi air) terhadap diameter zona hambat pada *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* secara *in vitro*.

1.3.3.3 Menganalisa golongan metabolit ekstrak etanol daun putri malu (*Mimosa pudica*) dan fraksinya (fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, fraksi n-butanol, dan fraksi air) yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* menggunakan metode KLT-bioautografi.

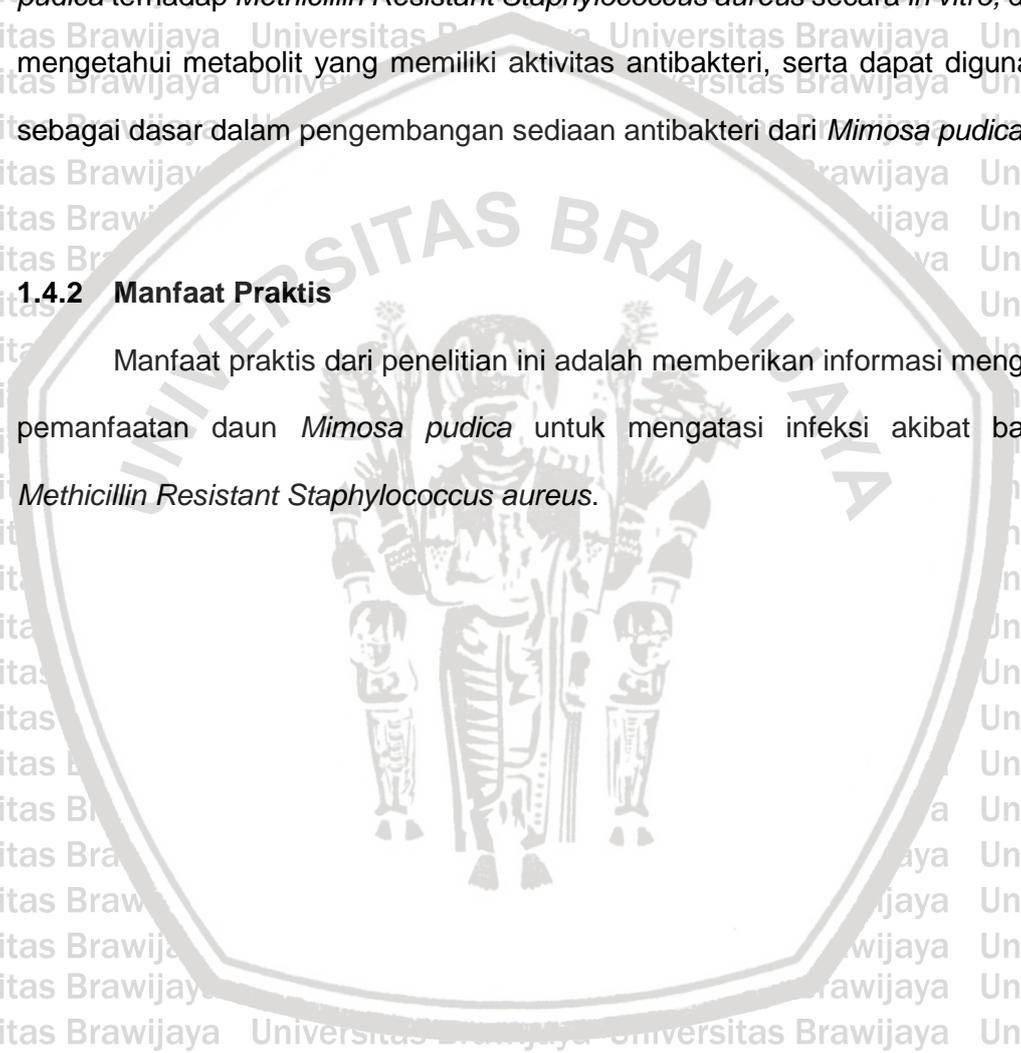
1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademik

Manfaat akademik dari penelitian ini adalah menambah ilmu pengetahuan mengenai aktivitas antibakteri ekstrak etanol dan fraksi ekstrak daun *Mimosa pudica* terhadap *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* secara *in vitro*, dapat mengetahui metabolit yang memiliki aktivitas antibakteri, serta dapat digunakan sebagai dasar dalam pengembangan sediaan antibakteri dari *Mimosa pudica*.

1.4.2 Manfaat Praktis

Manfaat praktis dari penelitian ini adalah memberikan informasi mengenai pemanfaatan daun *Mimosa pudica* untuk mengatasi infeksi akibat bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Tanaman *Mimosa pudica*

2.1.1 Deskripsi

Mimosa pudica adalah herba yang digolongkan kedalam famili Fabaceae, tanaman ini umum ditemukan di India dan kawasan Asia. *Mimosa pudica* telah banyak dikenal di Indonesia dengan nama putri malu.



Gambar 2.1 *Mimosa pudica* (Keng, 2017)

Mimosa pudica memiliki morfologi batang bercabang, dengan bulu yang runcing. Daunnya kecil dan apabila disentuh daun tersebut akan melipat secara bersamaan. Secara tradisional putri malu digunakan dalam sistem pengobatan India untuk pengobatan berbagai penyakit. *Mimosa pudica* akan berbunga dengan bentuk bola berwarna merah muda di musim panas, dan dapat tumbuh hingga ketinggian 5 kaki. *Mimosa pudica* di beberapa daerah sering dianggap menjadi gulma yang cukup berbahaya (Gurung, 2002).

2.1.2 Klasifikasi

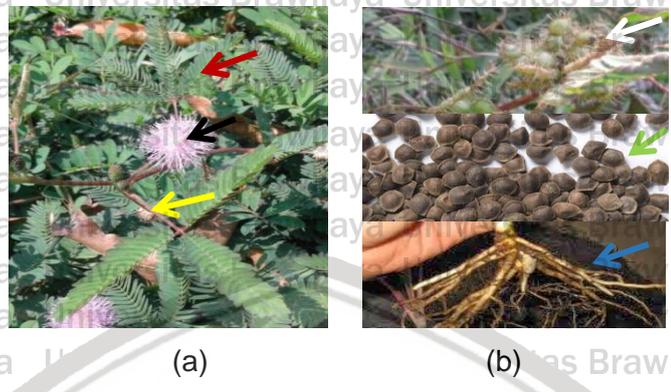
Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Fabales
Famili	: Fabaceae
Subfamili	: Mimosoideae
Bangsa	: Mimoseae
Genus	: <i>Mimosa</i>
Spesies	: <i>Mimosa pudica</i>

(Keng, 2017).

2.1.3 Sinonim

Tanaman putri malu memiliki banyak sinonim baik naman-nama lokal di Indonesia maupun diberbagai negara. Setiap daerah menyebut tanaman putri malu dengan nama yang berbeda-beda. Dalimartha (2006) menyebutkan *Mimosa pudica* memiliki sinonim *Mimosa asperata* Blanco, dengan nama daerah dan nama asing yang bebeda-beda, antara lain si hirput, si kerput (Batak), sikajuk (Minangkabau), jukuk ancing (Lampung), kucingan, randelik, ri sirepan (Jawa), rebha lo-malowan, r.dus-todusan (Madura), padang getap (Bali), daun kaget-kaget (Manado), putri malu, si kejut, daun rebah bangun (Melayu). Nama asing yang sering dikenal antara lain Han xiu cao, lajjalu, kruidje-roer-mij-niet, sensitive plant.

2.1.4 Morfologi dan Karakteristik *Mimosa pudica*



Gambar 2.2 Morfologi *Mimosa pudica* (Rakhmaningrum, 2015)

(Gambar a. Panah merah menunjukkan daun, panah hitam menunjukkan bunga, panah kuning menunjukkan batang; Gambar b. Panah putih menunjukkan buah, panah hijau menunjukkan biji, panah biru menunjukkan akar.)

Mimosa pudica memiliki daun majemuk ganda sempurna dengan tulang daun yang menyirip. Ujung daun runcing, dasar bulat, tepi rata, permukaan bagian atas dan bawah licin, panjang 6-16 mm, lebar 1-3 mm, berwarna hijau sedikit keunguan. Batang *Mimosa pudica* berbentuk bulat, berwarna coklat kemerahan, sangat kaku, ramping dan tumbuh hingga panjang 1,5 m, terdapat duri yang tersebar. Batangnya tegak saat muda, dan menjadi merambat saat bertambah usia. Bunga *Mimosa pudica* berbentuk bulat seperti bola, bertangkai, berwarna ungu kemerahan dengan kelopak yang sangat kecil dan peduncles yang berbulu dengan selaput berwarna putih. Buah *Mimosa pudica* terdiri dari 2-8 polong dengan panjang 1-2cm. Polong terdiri dari 2-5 segmen, didalamnya terdapat biji pipih berwarna coklat pucat dengan panjang 2.5 mm, benih *Mimosa pudica* berbentuk bulat dan rata. *Mimosa pudica* termasuk angiospermae dan berkembang biak dengan biji. Tanaman ini memiliki akar yang kuat (Rakhmaningrum, 2015 ; Arora dan Singh, 2017).

Keunikan tanaman *Mimosa pudica* terletak pada daunnya. Daun *Mimosa pudica* apabila disentuh, akan segera menutup. Hal ini disebabkan oleh perubahan tekanan turgor pada daun tulang, yang disebut seismonasti. *Mimosa pudica* menutup daunnya untuk melindungi diri dari hewan herbivora yang ingin memakannya (Rakhmaningrum, 2015).

2.1.5 Habitat dan Persebaran

Mimosa pudica dapat tumbuh di lahan pertanian, padang rumput, tanah lembab, perkebunan terbuka, hingga semak belukar. *Mimosa pudica* dapat tumbuh dengan mudah pada ketinggian 100-1300 mdpl (PIER, 2005).

Mimosa pudica pertama kali ditemukan di wilayah Brazil (Benua Afrika), kemudian dilaporkan terdapat di wilayah Costa Rica, Ecuador, El Salvador, Mexico, USA, Fiji, Tonga, Kepulauan Pasifik, Asia, hingga Australia (PIER, 2005).

2.1.6 Kandungan Kimia

Penelitian Gandhiraja *et al.*, (2009) menyebutkan bahwa skrining fitokimia ekstrak *Mimosa pudica* menunjukkan adanya komponen bioaktif seperti terpenoid, flavonoid, glikosida, alkaloid, kuinin, fenol, tanin, saponin dan koumarin.

Konstituen kimia lain yang ditemukan dalam daun *Mimosa pudica* meliputi mimosinin, asam mimosinat dan mimosamine, tirosin, alkaloid, senyawa fenolik, asam p-koumarat dan turunannya juga ditemukan terdapat dalam daun *Mimosa pudica*. Beberapa senyawa kimia yang sering dilaporkan memiliki aktivitas antibakteri seperti flavonoid, alkaloid, saponin, pigmen klorofil, tanin, koumarin dan furanokoumarin.

1. Saponin

Saponin merupakan senyawa metabolit sekunder polar yang terdiri dari unit aglycone yang terkait dengan satu atau lebih rantai karbohidrat. Unit aglycone atau sapogenin terdiri dari sterol atau unit triterpen yang lebih umum. Saponin dikenal terbagi kedalam dua golongan yakni saponin steroid dan saponin triterpenoid. Saponin memiliki sifat permukaan aktif atau bersifat deterjen karena bagian karbohidrat dari molekul larut dalam air, sedangkan sapogenin larut dalam lemak. Isolasi saponin dari bahan tanaman melibatkan ekstraksi dengan pelarut polar setelah pengangkatan lipid, dengan petroleum eter atau kloroform, diikuti oleh berbagai teknik pemurnian (Savage, 2003).

2. Kourmarin dan Turunannya

Kourmarin adalah senyawa metabolit sekunder non polar turunan α -pyrone yang merupakan glikosida bebas. Furanokourmarin adalah salah satu turunan kourmarin. Mereka dapat dikelompokkan ke dalam tipe linier, dimana cincin furan (dihidro) dilekatkan pada C6 dan C7, dan tipe angular, substitusi pada C7 dan C8. Petroleum eter merupakan pelarut yang umumnya digunakan dalam ekstraksi furanokourmarin dari jaringan tanaman, sedangkan kourmarin yang lebih polar dapat diekstraksi dengan metanol (Schwaber and Carmeli, 2007).

3. Alkaloid

Alkaloid merupakan senyawa metabolit sekunder yang umumnya bersifat semipolar hingga polar. Alkaloid mengandung satu atau lebih atom nitrogen (biasanya dalam cincin heterosiklik), tidak berwarna, berbentuk kristal, tidak mudah menguap. Beberapa senyawa golongan alkaloid

seperti nikotin memiliki karakteristik berbentuk cairan dan berwarna.

Sebagian besar alkaloid bersifat laevorotatory (aktif secara optik)

(Matsuura, 2015).

4. Tanin

Tanin merupakan senyawa metabolit sekunder kompleks yang umumnya bersifat polar dan memiliki polifenol bebas nitrogen dengan berat molekul tinggi. Tanin membentuk larutan koloid dengan air yang memberi reaksi asam. Tanin juga mengendapkan protein dan alkaloid. Tanin dapat diklasifikasikan menjadi tiga jenis yaitu tanin terhidrolisis, tanin terkondensasi, dan pseudo tanin (Hagerman, 1988).

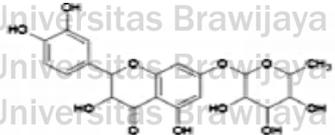
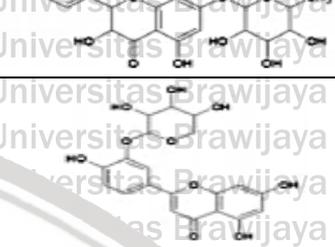
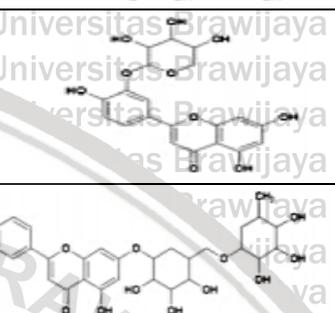
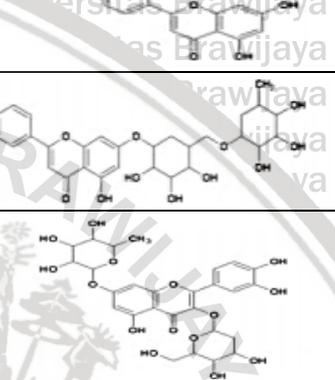
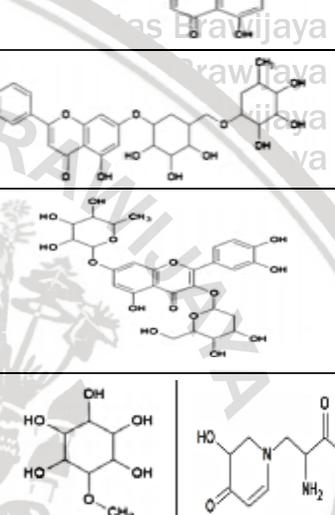
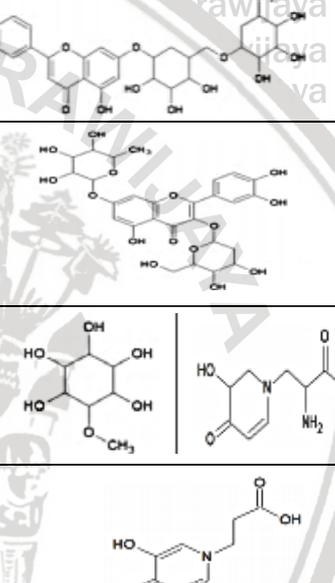
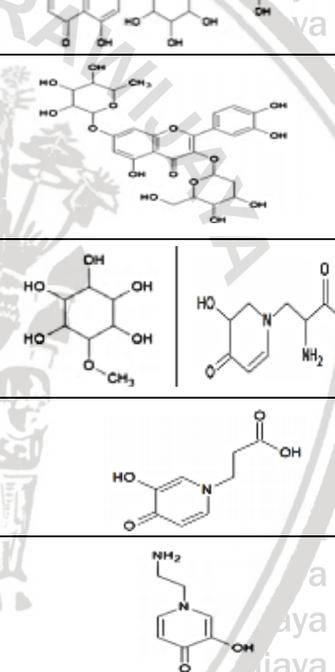
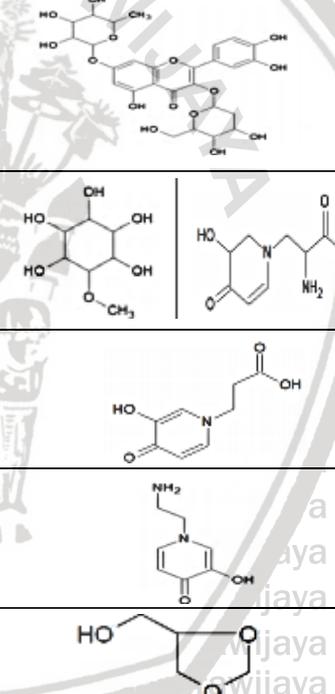
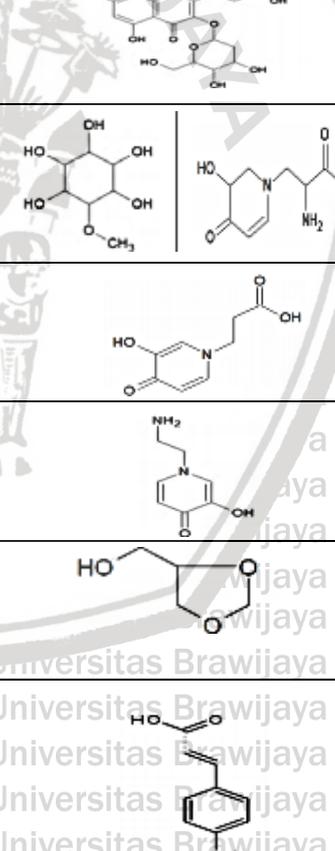
5. Flavonoid

Flavonoid merupakan senyawa metabolit sekunder yang dapat bersifat polar, semipolar, atau bahkan non polar bergantung pada jenis flavonoidnya. Flavonoid merupakan molekul polifenol yang mengandung 15 atom karbon. Mereka terdiri dari dua cincin benzen yang dihubungkan oleh rantai pendek tiga karbon. Salah satu karbon dalam rantai ini terhubung ke karbon di salah satu cincin benzene, baik melalui jembatan oksigen atau langsung (Panche, 2016).

6. Pigmen Klorofil

Klorofil merupakan senyawa non polar yang dibutuhkan tanaman untuk berfotosintesis. Molekul klorofil terdiri dari atom magnesium pusat dikelilingi oleh struktur yang mengandung nitrogen yang disebut cincin porfirin dan melekat pada cincin rantai samping karbon-hidrogen panjang, yang dikenal sebagai rantai phytol (Fajriyanti, 2017).

Tabel 2.1 Beberapa Kandungan Kimia *Mimosa pudica* dan Strukturnya

Nama Senyawa	Struktur
Quercetin-7-rhamnoside	
Luteolin-3-leuteolin-3xyloside	
cacetin-7-rutinoside	
Quercetin-3glucosidase-7-rhmnoside	
d-pinitol dan L-mimosine	
imosainic acid	
Mimosinamine	
3-Dioxolane-4-methanol	
p-caumaric acid	

(Sanaye et al., 2015)

2.1.7 Kegunaan dalam pengobatan Tradisional

Akar dan daun *Mimosa pudica* pada umumnya digunakan dalam pengobatan tradisional sebagai *astringent, acrid, cooling vulnerary, alexipharmic, diuretic, antispasmodic, emetic*, obat konstipasi dan obat penurun panas (Vaidyaratnam, 2001). Sistem pengobatan Ayurveda menggunakan *Mimosa pudica* sebagai pengobatan dalam kondisi gangguan peredaran darah, empedu, demam, sakit kuning, kusta, bisul, cacar, gangguan kulit, dan beberapa penyakit yang dikenal akibat infeksi bakteri (Abirami *et al.*, 2014). Sistem pengobatan Yunani menyebutkan bahwa *Mimosa pudica* dapat digunakan sebagai pengobatan pada kondisi jaundice, gangguan liver dan leprosy. Dekokta dari akar *Mimosa pudica* bermanfaat untuk meredakan sakit gigi, diare, disentri akibat amoeba, infeksi saluran kemih, dan dapat mempercepat proses penyembuhan. Beberapa penelitian menyebutkan bahwa *Mimosa pudica* dapat dimanfaatkan sebagai kontrasepsi apabila dikonsumsi secara sesuai. Menurut penelitian berbeda yang dilakukan sejauh ini, *Mimosa pudica* sering dimanfaatkan untuk menenangkan pikiran, meringankan depresi, dan tekanan mental. *Mimosa pudica* dapat meningkatkan kondisi psikologis dengan cara meningkatkan sirkulasi darah. *Mimosa pudica* dilaporkan beracun apabila dikonsumsi secara langsung, dan tidak dianjurkan untuk dikonsumsi oleh ibu hamil atau menyusui (Joseph *et al.*, 2013).

2.1.8 Aktivitas Farmakologis

Beberapa aktivitas farmakologis *Mimosa pudica* yang sudah diteliti antara lain (Joseph *et al.*, 2013) :

A. Aktivitas penyembuhan luka

Ekstrak metanol akar *Mimosa pudica* menunjukkan aktivitas penyembuhan luka yang sangat baik karena adanya unsur fenol.

B. Aktivitas analgesik dan antiinflamasi

Ekstrak etanol dari daun *Mimosa pudica* pada dosis 200 dan 400 mg / kg diuji untuk antiinflamasi dan analgesik. Hasil menunjukkan adanya penghambatan yang signifikan pada kondisi edema. Adanya flavonoid dalam ekstrak etanol berkontribusi pada aktivitas analgesik dan anti-inflamasi.

C. Antidiare

Ekstrak etanol yang diberikan pada mencit dengan dosis 200 dan 400 mg/kg secara signifikan dapat menghambat diare. Efek tersebut terkait dengan senyawa tanin dan flavonoid dalam ekstrak yang dapat mengurangi motilitas usus.

D. Aktivitas Antifertilitas

Ekstrak akar *Mimosa pudica*, bila diberikan secara oral dengan dosis 300 mg/kg berat badan/hari, secara berkepanjangan pada tikus albino terbukti dapat mempengaruhi perubahan siklus dan hormon LH/FSH dalam tubuh.

E. Aktivitas Antioksidan

Ekstrak kasar *Mimosa pudica* diuji secara in vitro untuk aktivitas antioksidan menggunakan DPPH. Hasil menunjukkan adanya aktivitas antioksidan moderat (IC_{50} 296.92 μ g/ml) dibandingkan dengan asam askorbat (IC_{50} 131.29 μ g/ml).

F. Aktivitas Antimalaria

Ekstrak etanol dari daun *Mimosa pudica* diuji pada tikus untuk mengetahui aktivitas antimalaria melawan *Plasmodium berghei*. Hasil menunjukkan adanya aktivitas antiplasmodial yang signifikan. Adanya beberapa konstituen

antiplasmodial seperti terpenoid, flavonoid dan alkaloid dianggap berperan pada aktivitas antimalaria.

G. Hepatoprotektif

Ekstrak etanol daun *Mimosa pudica* dievaluasi untuk aktivitas hepatoprotektif melawan karbon tetraklorida (CCl₄) yang menginduksi kerusakan hati pada tikus wistar. Ekstrak etanol dari daun *Mimosa pudica* (200 mg/kg berat badan) diberikan pada tikus percobaan selama 14 hari. Aktivitas hepatoprotektif dinilai dengan menggunakan berbagai parameter biokimia seperti glutamat oksaloasetat Transaminase (SGOT), glutamat piruvat transaminase (SGPT), alkaline phosphatase (ALP), bilirubin, dan total protein. Hasilnya menunjukkan tingkat malondialdehid serta aktivitas superoksida dismutase, glutathione dan katalase berkurang. Tingkat serum SGOT, SGPT, ALP dan bilirubin total, membaik mendekati nilai normal.

H. Aktivitas Antihyperglycemic

Penelitian menunjukkan bahwa konstituen yang aktif secara biologis seperti flavonoid, alkaloid glikosida yang ada dalam ekstrak kloroform *Mimosa pudica* memiliki peran dalam aktivitas hipolipidemia.

I. Aktivitas Antibakteri

Aktivitas antibakteri ekstrak metanol *Mimosa pudica* diuji pada *Aspergillus fumigatus*, *Citrobacter divergens* dan *Klebsiella pneumonia* pada konsentrasi berbeda, 50, 100 dan 200µg / disc. Aktivitas Antibakteri dikaitkan dengan adanya konstituen bioaktif seperti terpenoid, flavonoid, glikosida, alkaloid, kina, fenol, tanin, saponin dan kumarin.

2.1.9 Aktivitas Antibakteri Ekstrak *Mimosa pudica*

Penelitian Ranjan *et al.*, (2013) menyebutkan bahwa *crude* ekstrak *Mimosa pudica* mengandung konstituen tanin, protein dan steroid. Senyawa ini diketahui aktif secara biologis dalam membantu aktivitas antibakteri. Tanin diketahui dapat membentuk kompleks ireversibel dengan protein sehingga dapat menghambat sintesis protein sel. Senyawa steroid yang terdapat dalam ekstrak *Mimosa pudica* berhubungan dengan proses anabolik. Chandra dan Mukherjee (2012) menyebutkan terdapat manfaat dari beberapa ekstrak tanaman obat India, termasuk *Mimosa pudica* terhadap beberapa bakteri patogen seperti *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus niacini*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Geobacillus thermodenitrificans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Paenibacillus korensis*, *larva Paenibacillus*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* dan *Staphylococcus aureus*. Hasil uji antibakteri ekstrak metanol dari *Mimosa pudica* menunjukkan bahwa tanaman tersebut menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap mikroorganisme yang diuji pada tiga konsentrasi berbeda yaitu 50, 100 dan 200 µg/disk (Gandhiraja *et al.*, 2009). Pada penelitian Tamarasi dan Ananthi (2012), Hasil dari uji antibakteri ekstrak etanol *Mimosa pudica* menunjukkan bahwa tanaman tersebut menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap mikroorganisme yang diuji pada empat konsentrasi berbeda yaitu 25 µl, 50 µl, 75 µl dan 100 µl / disk. Zona hambat terbesar terdapat pada konsentrasi 100 µl / disk.

Pada penelitian Tomar *et al* (2014), diketahui zona hambat tertinggi dari ekstrak metanol daun *Mimosa pudica* terdapat pada mikroorganisme *E. coli* dan *Staphylococcus aureus*. Aktivitas terendah terdapat pada mikroorganisme

Bacillus Subtilis, dan *S. pyogenes*. Aktivitas hambatan sedang terdapat pada mikroorganisme *Pseudomonas aeruginosa* dengan MIC pada 225 mg/ml.

2.1.10 Aktivitas Antibakteri dari Fraksi *Mimosa pudica*

Fraksi metanol dari *Mimosa pudica* diketahui memiliki aktivitas sebagai antibakteri terhadap beberapa jenis mikroorganismenya seperti *Staphylococcus aureus*, *Coagulase Negative Staphylococci*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio*, *Enterococci*, *Candida albicans* dan *Salmonella typhi* (Rajendran, 2010).

2.2 Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

2.2.1 Klasifikasi

Kingdom	: Bacteria
Subkingdom	: Posibacteria
Phylum	: Firmicutes
Class	: Bacilli
Ordo	: Bacillales
Family	: Staphylococcaceae
Genus	: <i>Staphylococcus</i>
Species	: <i>Staphylococcus aureus</i>
Subspecies	: <i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i> (ITIS, 2017).

2.2.2 Deskripsi

Staphylococcus berasal dari bahasa Yunani, yang berarti banyak buah anggur (*staphyle*) dan berry (*kokkos*) (Jawetz *et al.*, 2005). *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri Gram positif yang hidup secara aerob dan fakultatif anaerob.

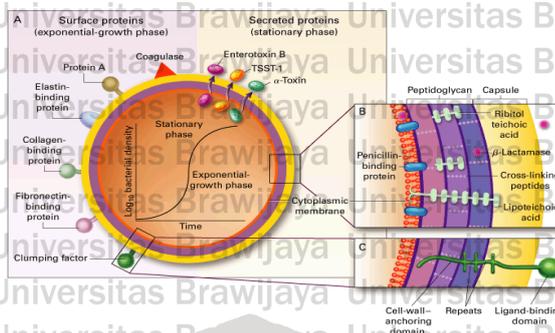
Salah satu jenis galur *Staphylococcus aureus* adalah *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA)*. *MRSA* merupakan bakteri penyebab berbagai penyakit menular seperti infeksi kulit, bakteremia, endokarditis, hingga pneumonia.

Bakteri *MRSA* diketahui telah resisten terhadap antibiotika isoxazolyl penicillin seperti methicillin, oxacillin dan flucloxacillin. *MRSA* juga dilaporkan telah resisten terhadap antibiotik golongan betalaktam, makrolida, tetrasiklin, kloramfenikol, dan kuinolon (Gnanamani *et al.*, 2017).

2.2.3 Morfologi *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA)*

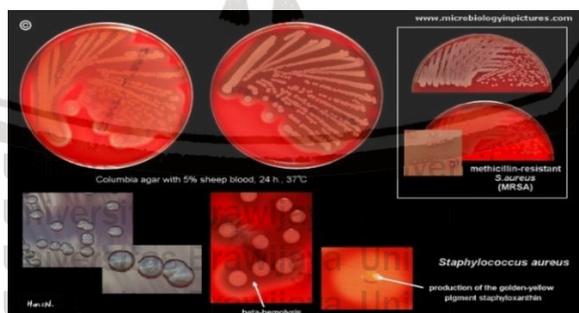
Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) adalah bakteri gram positif yang menghasilkan pigmen kuning, berbentuk bulat kasar dengan permukaan halus, dan memiliki ukuran diameter sel berkisar antara 0,5 µm sampai 1,0 µm. Bakteri ini dapat hidup secara aerob dan fakultatif anaerob, tidak membentuk spora, dan tidak bergerak. *MRSA* hidup berkelompok secara tidak beraturan, sehingga nampak berbentuk seperti buah anggur apabila diamati dibawah mikroskop. Koloni *MRSA* dikelilingi oleh zona beta-hemolisis yang jelas, menghasilkan katalase dan memberikan hasil positif bila dilakukan tes koagulase.

MRSA dapat tumbuh optimum pada suhu 37°C dengan waktu pembelahan 0,47 jam. Bakteri ini dapat menyebabkan berbagai penyakit menular seperti infeksi kulit, asbes, bakteremia, endokarditis, pneumonia hingga septikimia (Gnanamani *et al.*, 2017; Jawetz *et al.*, 2005).



Gambar 2.3. Struktur *Staphylococcus aureus* (Lowy, 1998).

Galur *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) memiliki morfologi yang sama dengan *Staphylococcus aureus*, namun dilaporkan memiliki zona beta hemolisis yang lebih kecil daripada *Staphylococcus aureus* (Newman, 2017). Untuk mengetahui adanya MRSA, terdapat dua metode, yaitu metode molekuler (*real-time PCR*, penyelidikan DNA, dan penyelidikan asam nukleat peptida (*peptide nucleic acid*)) serta metode konvensional. Untuk mengidentifikasi MRSA secara konvensional dibutuhkan beberapa media agar, antara lain media *Mannitol Salt Agar* (MSA) dan media Agar Darah Domba (ADD). Bakteri MRSA akan diketahui dengan adanya perubahan warna indikator pH pada media tersebut (Newman, 2017). Pada media Agar Darah Domba (ADD), bakteri MRSA merubah warna media dari merah menjadi lebih pudar (merah muda) (Newman, 2017).



Gambar 2.4. *Staphylococcus aureus* dan MRSA pada Columbia agar dengan darah domba defibrinated 5% (Bio-Rad™) (Newman, 2017).

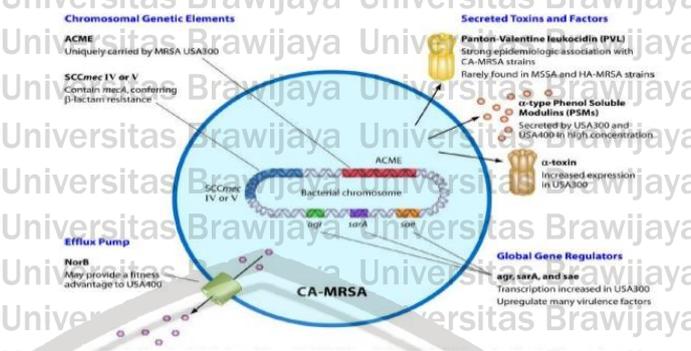
Struktur bakteri *MRSA* terdiri atas komponen esensial dan komponen non esensial. Komponen esensial bakteri di antaranya adalah (Parker dan Hewitt, 1970) :

- a. Dinding sel, tersusun oleh peptidoglikan dan asam teikoat (antigen permukaan).
- b. Membran sitoplasma, merupakan lipoprotein berlapis ganda yang berperan pada transport enzim.
- c. Ribosom, mengandung RNA dan protein pada subunit 50s dan 30s.
- d. Mesosom, berperan dalam aktivitas pembelahan dan sekresi.
- e. Periplasma adalah rongga membran plasma dan membran luar yang mengandung banyak enzim hidrolitik diantaranya adalah enzim betalaktamase.
- f. Inti sel

Komponan non esensial dari bakteri terdiri dari:

- a. Kapsul bakteri tersusun oleh polisakarida dan berfungsi sebagai proteksi terhadap fagositosis.
- b. Plasmid
- c. Granula terdiri atas glikogen, lipid dan polifosfat. Granula adalah tempat penyimpanan nutrisi yang berada di sitoplasma.
- d. Glikokaliks juga tersusun oleh polisakarida dan membantu penempelan bakteri ke permukaan sel.

2.2.4 Patogenesis *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA)



Gambar 2.5. Faktor Virulensi dan Mutasi Genetik pada *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) (David, 2010)

Proses infeksi *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA)

melibatkan lima tahap, meliputi (1) kolonisasi, (2) infeksi lokal, (3) diseminasi sistemik dan / atau sepsis, (4) infeksi metastatik dan (5) toksinoksik. Patogenesis MRSA terjadi akibat adanya faktor virulensi yang dimiliki dan diproduksi bakteri sebagai mekanisme pertahanan. Faktor-faktor ini memungkinkan organisme tersebut menjadi patogen yang menyebabkan berbagai infeksi manusia dan hewan. Faktor virulensi membantu keterikatan pada sel inang, menghancurkan perisai kekebalan inang, invasi jaringan, menyebabkan sepsis dan mengeluarkan sindrom yang dimediasi toksin. Berdasarkan mekanisme tindakan dan perannya dalam patogenesis, faktor virulensi MRSA diklasifikasikan sebagaimana ditunjukkan pada tabel berikut.

Tabel 2.2 Faktor virulensi MRSA dan Karakteristiknya

Faktor	Karakteristik
Membantu keterikatan pada jaringan inang	
Microbial adhesive (MSCRAMM)	Protein permukaan sel yang berinteraksi dengan molekul inang seperti kolagen, fibronectin & fibrinogen, sehingga memudahkan pelekatan jaringan. Protein staphylococcal A, protein pengikat fibronectin A dan B, protein pengikat kolagen & faktor penggumpalan A & B termasuk dalam golongan ini. Komponen ini juga terlibat dalam menghindari sistem kekebalan inang.
Menghindari kekebalan host	
Mikrokapsul polisakarida	Menolak fagositosis oleh fagosit polimorfonuklear
Protein A	Berikatan dengan bagian Fc imunoglobulin, mencegah opsonisasi, berfungsi sebagai antigen super dan membatasi respon imun inang
Panton-Valentine leukocidin (PVL)	PVL ditemukan di sebagian besar community-associated MRSA (CA-MRSA). PVL termasuk dalam kelompok pori-pori membran yang membentuk protein. Terdiri dari dua komponen protein (LukS-PV dan LukF-PV) yang bertindak bersama sebagai subunit dan membentuk pori pada membran sel sel inang, yang menyebabkan kebocoran isi sel dan kematian sel.
Protein penghambat chemotaxis <i>S. aureus</i> (CHIPS)	CHIPS adalah protein ekstraselular yang menghambat fungsi chemotaxis neutrofil dan monosit.
Invasi jaringan	
<i>Extracellular adherence protein</i> (Eap)	Eksoprotein yang mengikat matriks sel inang, protein plasma & molekul adhesi sel endotel ICAM-1. Selain peran adhesi dan invasi, ia juga memiliki aktivitas modulasi sistem imun.
Protease, lipase, nuklease, hyaluronatylase, phospholipase C, metaloprotease (elastase), katalase, koagulase, & Staphylokinase	Enzim ekstraselular ini menyebabkan kerusakan jaringan dan, dengan demikian, membantu penetrasi bakteri ke dalam jaringan.
Menginduksi toksinosis	
Enterotoxins	<i>S. aureus</i> menghasilkan enterotoksin yang merupakan eksotoksin gastrointestinal. Keracunan makanan " <i>Staphylococcal</i> " adalah keracunan yang berakibat dari konsumsi makanan yang mengandung cukup banyak enterotoksin.
<i>Toxic shock syndrome toxin -1</i> (TSST-1)	TSST-1 & beberapa enterotoksin disebut sebagai antigen toksin pirogenik. TSST-1 menyebabkan <i>toxic shock syndrome</i> terutama pada wanita menstruasi.
Exfoliative toxin A dan B	Protein serin yang secara selektif mengenali dan menghidrolisis protein desmosom di kulit. ET menyebabkan <i>staphylococca-scalded skin syndrome</i> .

(Gnanamani et al., 2017).

2.2.5. Pembenihan

Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) dapat tumbuh dengan baik pada suhu 35° C -37° C, dan dapat bertahan pada suhu 6,4° C - 45° C. Bakteri ini dapat tumbuh pada pH 4,0 – 9,8 dengan pH optimum 7,0 – 7,5.

MRSA tidak dapat tumbuh pada media sintetik yang tidak mengandung asam amino atau protein. Media yang biasa digunakan adalah *manitol salt agar*, *columbia agar* dan *blood agar* (Supardi dan Sukanto, 1999).

2.2.6. Temuan Klinis

Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) menyebabkan berbagai macam infeksi pada manusia. Infeksi klinis *MRSA* dikelompokkan ke dalam kategori komunitas dan nosokomial berdasarkan asal infeksi. Infeksi akibat *MRSA* yang sering ditemukan meliputi adalah bakteremia, endokarditis infeksi, infeksi kulit dan jaringan lunak, infeksi osteoartikular dan infeksi pleuropulmonary. Infeksi lainnya seperti abses epidural, meningitis, toksik syok sindrom dan infeksi saluran kencing (Gnanamani *et al.*, 2017).

2.2.7. Antibakteri

Antibakteri merupakan senyawa alami maupun sintetik yang memiliki efek hambatan atau menekan proses biokimiawi di dalam organisme, khususnya dalam proses infeksi oleh mikroba. Secara sekilas antibakteri dibagi menjadi beberapa jenis berdasarkan mekanisme hambatannya (Jawetz *et al.*, 2005).

1. Antibakteri yang mengganggu biosintesis dinding sel bakteri, misalnya β -laktam (misalnya penisilin) dan kelompok glikopeptida (misalnya vankomisin).

2. Antibakteri yang termasuk kelompok peptida yang mengandung lanthionine, misalnya nisin yang dapat merusak molekul membran sel bakteri.
3. Antibakteri yang menghambat sintesis protein bakteri, misal kelompok makrolid.
4. Antibakteri yang menghambat proses translasi, misal kelompok aminoglikosida.
5. Antibakteri yang bekerja dengan cara menghambat interaksi kodon-antikodon antara mRNA dan tRNA, misal golongan tetrasiklin.

2.2.7.1. Antibakteri Vankomisin

Vankomisin adalah antibiotik golongan glikopeptida. Vankomisin adalah antibiotik bakterisidal (membunuh bakteri) yang bekerja dengan mekanisme menghambat sintesis dinding sel, mengubah permeabilitas membran sel, dan menghambat sintesis RNA bakteri gram positif. Vankomisin aktif melawan sejumlah besar bakteri Gram positif, seperti *Staphylococcus aureus* (termasuk strain resisten methicillin), *Staph. epidermidis* (termasuk strain resisten ganda), *Streptococcus pneumoniae* (termasuk strain resisten ganda), *Str. pyogenes*, *Str. agalactiae*, *Str. bovis*, *Str. mutans*, *Lactobacillus*, dan sebagainya (Watanakunakorn, 1984). Saat ini vankomisin tersedia untuk diberikan dalam rute oral dan parenteral (BPOM, 2017).

2.2.8. Resistensi Antibakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA)

Resistensi antibiotik merupakan kondisi ketika suatu strain bakteri menjadi resisten terhadap antibakteri tertentu. Resistensi ini berkembang secara alami

melalui mutasi evolusi acak dan juga bisa direayasa oleh pemakaian obat antibiotik yang tidak tepat. Resistensi merupakan salah satu masalah kesehatan utama di dunia. Contoh bakteri yang telah menjadi resisten terhadap antibiotik termasuk spesies *Staphylococcus aureus* dengan galur *MRSA*. Bakteri *MRSA* dilaporkan resisten terhadap antibiotika isoxazolyl penicillin seperti methicillin, oxacillin dan flucloxacillin, dan beberapa antibiotika betalaktam, makrolida, aminoglikosida, tetrasiklin, kloramfenikol, dan kuinolon (Gnanamani *et al.*, 2017).

Hasil penelitian Udobi *et al.*, (2013) pada tiga lokasi rumah sakit yang berbeda di Nigeria, melaporkan jika bakteri *MRSA* menunjukkan tingkat resistensi terhadap ampisilin dengan presentase 100% di ketiga lokasi, pefloxacin dengan presentase sebesar 90,9%, 72,2%, 66,7%, ceftriaxone dengan presentase sebesar 69,7%, 72,2%, 70,8%, gentamisin dengan presentase sebesar 54,5%, 52,8%, 37,5% , dan ciprofloxacin dengan presentase sebesar 51,5%, 47,2%, 35,4%. Hasil penelitian Pai *et al.*, (2010) menunjukkan bahwa resistensi klindamisin pada bakteri *MRSA* ditemukan sebesar 18,8%, sekitar 40-50% bakteri *MRSA* resisten terhadap eritromisin, gentamisin, dan kloramfenikol, dan sekitar 30% bakteri *MRSA* resisten terhadap siprofloksasin dan amikasin. Namun, semua strain bakteri *MRSA* yang diuji masih sensitif terhadap antibiotik vankomisin. Hasil tersebut serupa dengan penelitian Wijaya (2014), yang melaporkan sensitivitas antibakteri terbesar terhadap bakteri *MRSA* terdapat pada antibiotik vankomisin dengan presentase sebesar 80% dari semua isolat.

2.2.9. Mekanisme Resistensi *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) terhadap Antibakteri

1. Resistensi Betalaktam

a. Resistensi Penisilin

Isolat resisten penisilin membawa gen plasmid, blaZ yang mengkodekan enzim beta-laktamase, yang disebut sebagai penisilinase.

Enzim ini mampu membelah cincin beta-laktam penisilin sehingga terjadi inaktivasi antibiotik (Gnanamani *et al.*, 2017).

b. Resistensi Methicillin

Methicillin diperkenalkan ke klinik pada tahun 1961 dan kemudian dilaporkan terdapat strain yang menunjukkan resistensi methicillin (MRSA) pada tahun yang sama. *Staphylococcus aureus* berubah menjadi resisten terhadap metisilin karena mendapat sisipan suatu elemen DNA SCCmec berukuran 20-100 kb. SCCmec mengandung mecA yaitu gen yang menyandi PBP2a. Perubahan pada PBP yang normal (PBP2) menjadi PBP2a merupakan dasar terjadinya resistensi. PBP2a memiliki afinitas yang sangat rendah terhadap betalaktam sehingga MRSA tetap dapat hidup dan mensintesa dinding sel sekalipun bakteri ini berada pada media mengandung konsentrasi tinggi betalaktam (Gnanamani *et al.*, 2017).

2. Resistensi Kuinolon

Kuinolon bekerja sebagai antibakteri dengan menghambat topoisomerase bakteri (topoisomerase IV dan DNA Gyrase). Resistensi terhadap kuinolon pada *S. aureus* muncul karena mutasi titik terutama pada subunit GrlA (subunit topoisomerase IV) dan subunit GyrA (subunit Gyrase).

Mekanisme tambahan dimana *S. aureus* menjadi resisten terhadap kuinolon

adalah dengan mengekspresikan pompa eflux *norA*. Pada tahun 2008, resistensi fluoroquinolone di antara isolat *MRSA* yang terlibat dalam infeksi bakteri dan kulit akut (ABSSSI) di rumah sakit adalah 70,3% (Gnanamani *et al.*, 2017).

3. Resistensi Antibiotik Lainnya

Obat-obatan seperti sulfonamida, tetrasiklin, aminoglikosida, kloramfenikol dan klindamisin tidak digunakan karena kurangnya aktivitas, sementara vankomisin tetap menjadi terapi utama. Resistensi terhadap sulfonamida dan trimetoprim, tetrasiklin, aminoglikosida, kloramfenikol dan klindamisin, dilaporkan terjadi secara luas pada *S. aureus* terutama bakteri *MRSA*. Resistensi *MRSA* terhadap makrolida disebabkan gen *ermA* yang terkait dengan Tn554 yang terdapat pada SCC*mec*. Ekspresi gen ini akan mengubah molekul target dari antimikroba makrolida tersebut. Resistensi *MRSA* terhadap makrolida juga dapat diperantarai oleh *active efflux* yang dikendalikan gen *msrA* (Wong *et al.*, 2009). Resistensi *MRSA* terhadap tetrasiklin terjadi melalui mekanisme *efflux* yang dikendalikan gen *tetA* dan *tetB* dan proteksi ribosom oleh protein TetM, TetO, TetS, dll yang akan melekat pada ribosom sehingga tetrasiklin akan terlepas dari ribosom dan menjadi tidak aktif (Kadlec dan Schwarz, 2009).

2.2.10 Uji Kepekaan Antibakteri secara *In vitro*

Kemampuan antibakteri dalam melawan bakteri dapat diukur menggunakan beberapa metode, yaitu:

1. Metode Dilusi

Metode dilusi terdiri dari dua teknik pengerjaan, yaitu teknik dilusi perbenihan cair dan teknik dilusi agar (Soleha, 2015).

a. Dilusi perbenihan cair, menggunakan antibakteri yang disediakan pada berbagai macam pengenceran biasanya dalam satuan $\mu\text{g/ml}$, konsentrasi bervariasi tergantung jenis dan sifat antibakteri. Konsentrasi terendah yang menunjukkan hambatan pertumbuhan dengan jelas baik dilihat secara visual atau menggunakan alat, disebut dengan konsentrasi daya hambat minimum (Soleha, 2015).

b. Dilusi agar, antibakteri sesuai dengan pengenceran akan ditambahkan ke dalam agar, sehingga memerlukan perbenihan agar sesuai jumlah pengenceran ditambah satu perbenihan agar untuk kontrol tanpa penambahan antibakteri (Soleha, 2015).

2. Metode Difusi

a. *Disk Diffusion*, Cakram kertas yang telah dibubuhkan sejumlah tertentu antibakteri, ditempatkan pada media yang telah ditanami organisme yang akan diuji secara merata. Konsentrasi dari antibakteri ditentukan oleh difusi dari cakram. Pertumbuhan organisme uji dihambat penyebarannya sehingga terbentuk zona jernih disekitar cakram. Hasil dari tes kepekaan, mikroorganisme diklasifikasikan ke dalam beberapa kategori, yaitu sensitif, intermediet, dan resisten. Zona hambat cakram antibakteri pada metode difusi berbanding terbalik dengan MIC. Semakin luas zona hambat, maka semakin kecil konsentrasi MIC (Soleha, 2015).

- b. Sumuran, Metode ini memanfaatkan prinsip difusi dari sediaan dalam sumuran / lubang yang telah dibuat pada agar padat yang telah diinokulasikan bakteri. Pertumbuhan organisme uji dihambat penyebarannya sehingga terbentuk zona jernih disekitar cakram (Soleha, 2015).

3. Metode Bioautografi

Bioautografi adalah suatu metode pendeteksian untuk menemukan suatu senyawa antimikroba yang belum teridentifikasi dengan cara melokalisir aktivitas antimikroba tersebut pada suatu kromatogram. Metode ini memanfaatkan pengerjaan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Prosedur dalam metode bioautografi serupa yang digunakan dalam metode difusi agar. Perbedaannya adalah bahwa senyawa yang diuji menyebar ke media agar diokulasi dari lapisan kromatografi. Dari hasil inkubasi pada suhu dan waktu tertentu akan terlihat zona hambatan di sekeliling spot dari KLT yang telah ditempelkan pada media agar (Choma dan Grzelak, 2011). Zona hambatan ditampakkan oleh aktivitas senyawa aktif yang terdapat di dalam bahan yang diperiksa terhadap pertumbuhan mikroorganisme uji. Bioautografi dapat dipertimbangkan karena paling efisien untuk mendeteksi komponen antimikroba, sebab dapat melokalisir aktivitas meskipun dalam senyawa aktif tersebut terdapat dalam bentuk senyawa kompleks dan dapat pula diisolasi langsung dari komponen yang aktif (Akhyar, 2010).

Bioautografi terdiri dari beberapa jenis yaitu:

- a. Bioautografi kontak: plat KLT atau kromatogram kertas ditempatkan pada permukaan agar yang diinokulasi selama beberapa menit, atau jam untuk memungkinkan proses difusi. Selanjutnya, lempeng dilepas dan lapisan agar-

agar diaduk. Zona pertumbuhan penghambatan muncul di tempat, dimana senyawa antimikroba bersentuhan dengan lapisan agar-agar.

b. Bioautografi immersion (agar-overlay): pelat KLT terlebih dahulu direndam atau ditutup dengan media agar, yang selanjutnya ditambahkan dengan mikroorganisme yang diuji dan kemudian diinkubasi. Metode ini adalah kombinasi kontak dan bioautografi langsung, karena senyawa antimikroba dipindahkan dari kromatogram ke media agar seperti pada metode kontak, namun lapisan agar tetap berada di permukaan kromatogram selama inkubasi dan visualisasi, seperti pada bioautografi langsung.

c. Bioautografis langsung : prinsip metode ini adalah bahwa pelat KLT yang dicelupkan ke dalam suspensi mikroorganisme yang tumbuh dalam kaldu yang tepat dan kemudian diinkubasi. Permukaan silika dari pelat KLT yang dilapisi media kaldu menjadi sumber nutrisi dan memungkinkan pertumbuhan mikroorganisme secara langsung di atasnya. Namun, di tempat senyawa aktif antimikroba terlihat zona penghambatan pertumbuhan mikroorganisme terbentuk. Visualisasi zona ini biasanya dilakukan dengan mendeteksi aktivitas dehidrogenase menggunakan garam tetrazolium. Aktivitas dehidrogenase mikroorganisme dapat mengubah garam tetrazolium menjadi formaldehid yang sangat berwarna. Akibatnya, bintik-bintik putih kecoklatan muncul di permukaan pelat KLT dengan latar belakang ungu, yang menunjukkan adanya agen antibakteri (Choma dan Grzelak, 2011).

2.3 Ekstraksi

Ekstraksi berasal dari bahasa latin "*extractio* atau *extrahere*" yang berarti menarik keluar. Komponen yang ditarik adalah senyawa-senyawa kimia dari tumbuhan

dan atau hewan. Dalam pengerjaannya harus dipertimbangkan pemilihan pelarut yang tepat, agar dapat menarik keluar bahan aktif tersebut (Harborne, 1987).

2.3.1 Jenis Ekstraksi

Secara umum terdapat dua jenis ekstraksi, yaitu ekstraksi secara panas (misalnya refluks, penyulingan uap air) dan ekstraksi secara dingin (misalnya maserasi, perkolasi dan soxhletasi) (Dirjen POM, 1986).

2.3.2 Metode Ekstraksi

1. Soxhletasi

Metode ini pada dasarnya merupakan ekstraksi secara berkesinambungan. Cairan penyari dipanaskan sampai mendidih, kemudian uap penyari akan naik melalui pipa, kemudian diembunkan lagi oleh pendingin tegak. Cairan penyari turun untuk menyari zat aktif dalam simplisia. Selanjutnya bila cairan penyari mencapai sifon, maka seluruh cairan akan turun ke labu alas bulat dan terjadi proses sirkulasi. Demikian seterusnya sampai zat aktif yang terdapat dalam simplisia tersari seluruhnya yang ditandai jernihnya cairan yang lewat pada tabung sifon (Harbone, 1987; Dirjen POM, 1986).

2. Perkolasi

Perkolasi merupakan cara penyarian yang dilakukan dengan mengalirkan cairan penyari melalui serbuk simplisia yang telah dibasahi. Prinsip perkolasi adalah serbuk simplisia ditempatkan dalam suatu bejana silinder, yang bagian bawahnya diberi sekat berpori. Cairan penyari dialirkan dari atas ke bawah melalui serbuk tersebut, cairan penyari akan melarutkan zat aktif sel-sel yang dilalui sampai mencapai keadaan jenuh. Kekuatan yang berperan pada perkolasi antara

lain: gaya berat, kekentalan, daya larut, tegangan permukaan, difusi, osmosa, adhesi, daya kapiler dan daya geseran (friksi) (Harbone, 1987; Dirjen POM, 1986).

3. Maserasi

Maserasi dilakukan dengan cara memasukkan 10 bagian simplisia dengan derajat yang cocok ke dalam bejana, kemudian dituangi dengan penyari 75 bagian, ditutup dan dibiarkan selama 5 hari, terlindung dari cahaya sambil diaduk sekali-kali setiap hari lalu diperas dan ampasnya dimaserasi kembali dengan cairan penyari. Penyarian diakhiri setelah pelarut tidak berwarna lagi, lalu dipindahkan ke dalam bejana tertutup, dibiarkan pada tempat yang tidak bercahaya, setelah dua hari lalu endapan dipisahkan (Harbone, 1987; Dirjen POM, 1986).

4. Refluks

Ekstraksi dengan cara ini pada dasarnya adalah ekstraksi berkesinambungan. Bahan yang akan diekstraksi direndam dengan cairan penyari dalam labu alas bulat yang dilengkapi dengan alat pendingin tegak, lalu dipanaskan sampai mendidih. Cairan penyari akan menguap, uap tersebut akan diembunkan dengan pendingin tegak dan akan kembali menyari zat aktif dalam simplisia tersebut, demikian seterusnya. Ekstraksi ini biasanya dilakukan 3 kali dan setiap kali diekstraksi selama 4 jam (Harbone, 1987; Dirjen POM, 1986).

5. Penyulingan

Penyulingan dapat dipertimbangkan untuk menyari serbuk simplisia yang mengandung komponen kimia yang mempunyai titik didih yang tinggi pada tekanan udara normal, yang pada pemanasan biasanya terjadi kerusakan zat aktifnya (Harbone, 1987; Dirjen POM, 1986).

6. Accelerated solvent extraction (ASE)

Merupakan bentuk ekstraksi pelarut cair yang efisien dibandingkan dengan maserasi dan ekstraksi Soxhlet karena metode ini menggunakan pelarut dengan jumlah minimal. Teknologi ekstraksi otomatis ini mampu mengendalikan suhu dan tekanan untuk setiap sampel individu dan membutuhkan waktu kurang dari satu jam untuk ekstraksi (Azwanida, 2015).

7. Ultrasound-assisted extraction (UAE)

UEA melibatkan penggunaan ultrasound mulai dari 20 kHz sampai 2000 kHz. Efek mekanik kavitasi akustik dari ultrasound meningkatkan kontak permukaan antara pelarut, sampel dan permeabilitas dinding sel. Sifat fisik dan kimia bahan yang terkena ultrasound diubah dan mengganggu dinding sel tanaman, memfasilitasi pelepasan senyawa dan meningkatkan transportasi massal pelarut ke dalam sel tanaman (Azwanida, 2015).

8. Supercritical fluid extraction (SFE)

SFE atau juga disebut sebagai gas padat adalah zat yang memiliki sifat fisik gas dan cairan pada titik kritisnya. Faktor-faktor seperti suhu dan tekanan adalah faktor penentu yang mendorong suatu zat ke daerah kritisnya. Kelemahan utama metode ini adalah biaya awal peralatan sangat tinggi (Azwanida, 2015).

9. Microwave assisted extraction (MAE)

MAE memanfaatkan energi gelombang mikro untuk memudahkan partisi analit dari matriks sampel ke dalam pelarut. Radiasi gelombang mikro menyebabkan pemanasan di dekat permukaan material dan panas dipindahkan melalui konduksi. Rotasi dipole dari molekul yang diinduksi oleh elektromagnetik gelombang mikro mengganggu ikatan hidrogen; meningkatkan migrasi ion terlarut dan mendorong penetrasi pelarut ke dalam matriks (Azwanida, 2015).

2.3.3 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Hasil Ekstraksi

1. Ukuran Bahan

Pengecilan ukuran bertujuan untuk memperluas permukaan bahan sehingga mempercepat penetrasi pelarut ke dalam bahan yang akan diekstrak dan mempercepat waktu ekstraksi (Tiwari *et al.*, 2011).

2. Suhu Ekstraksi

Ekstraksi akan lebih cepat dilakukan pada suhu tinggi, tetapi untuk beberapa komoditas dapat menimbulkan kerusakan. Ekstraksi baik dilakukan pada kisaran suhu 30-50°C (Tiwari *et al.*, 2011).

3. Pelarut

Jenis pelarut yang digunakan merupakan faktor penting dalam ekstraksi. Pemilihan pelarut didasarkan pada (Tiwari *et al.*, 2011) :

a. Selektifitas

Pelarut hanya boleh melarutkan ekstrak yang diinginkan, bukan komponen-komponen lain dari bahan ekstraksi.

b. Kelarutan

Pelarut sedapat mungkin memiliki kemampuan melarutkan ekstrak yang besar (kebutuhan pelarut lebih sedikit).

c. Kemampuan untuk tidak saling bercampur

Pada ekstraksi cair-cair, pelarut tidak boleh atau hanya secara terbatas larut dalam bahan ekstraksi.

d. Polaritas

Pemilihan suatu pelarut harus mempertimbangkan sifat kepolarannya. Untuk mengetahui kepolaran, maka dapat diketahui berdasarkan tetapan dielektrik (TD) suatu senyawa yang didasarkan pada efek elusinya.

Peningkatan nilai elusi diiringi dengan peningkatan kepolaran. Pelarut polar memiliki tingkat kepolaran yang tinggi, cocok untuk mengekstrak senyawa-senyawa yang polar dari tanaman. Pelarut polar cenderung universal digunakan karena biasanya walaupun polar, tetap dapat menyari senyawa-senyawa dengan tingkat kepolaran lebih rendah. Salah satu contoh pelarut polar adalah: air, metanol, etanol, asam asetat. Pelarut semipolar memiliki tingkat kepolaran yang lebih rendah dibandingkan dengan pelarut polar. Pelarut ini baik untuk mendapatkan senyawa-senyawa semipolar dari tumbuhan. Contoh pelarut ini adalah: aseton, etil asetat, kloroform. Pelarut nonpolar baik untuk mengekstrak senyawa-senyawa yang sama sekali tidak larut dalam pelarut polar. Senyawa ini baik untuk mengekstrak berbagai jenis minyak. Contoh: heksana, eter (Stahl, 1985).

Tabel 2.3 Deret Eluotropi Pelarut

Pelarut	Titik Didih (°C/750 torr)	Tetapan Dielektrik pada Suhu 20 °C
n-Heksana	68,7	1,890
Toluena	110,6	2,379
Kloroform	61,3	4,806
Eter	34,6	4,34
Etil Asetat	77,1	6,02
Asam Asetat	30,9	6,15
Asteon	56,5	20,70 (T = 25 °C)
Etanol	78,5	24,30 (T = 25 °C)
Metanol	64,6	33,62
Air	100,0	80,37

(Stahl, 1985)

Adapun parameter kualitas dari ekstraksi tergantung oleh berbagai hal seperti jenis bahan yang digunakan, jenis pelarut, dan prosedur ekstraksi.

Sementara hasil bahan aktif yang diekstraksi dipengaruhi oleh beberapa faktor yakni ukuran bahan, tipe ekstraksi, waktu ekstraksi, temperatur, jenis pelarut, pH, konsentrasi pelarut, dan polaritas (Tiwari *et al.*, 2011).

2.4 Fraksinasi

Fraksinasi merupakan prosedur pemisahan yang bertujuan untuk memisahkan golongan utama kandungan yang satu dari kandungan yang lain yang memiliki karakteristik yang berbeda menggunakan proses fraksional. Prinsip dari fraksinasi adalah penggabungan senyawa berdasarkan bercak noda pada lempeng dengan pengamatan pada UV 254 nm dan 366. Metode fraksinasi dapat dilakukan melalui ekstraksi cair-cair atau kromatografi (Graham dan Rickwood, 1997).

2.4.1 Partisi Cair-Cair

Partisi cair-cair dilakukan dengan cara pemisahan komponen kimia diantara 2 fase pelarut yang tidak saling bercampur. Dimana sebagian komponen larut pada fase pertama, dan sebagian larut pada fase kedua. Lalu kedua fase yang mengandung zat terdispersi dikocok, dan dibiarkan sampai terjadi pemisahan sempurna dan terbentuk dua lapisan fase zat cair. Komponen kimia akan terpisah ke dalam dua fasa sesuai tingkat kepolarannya (Sudjadi, 1988). Partisi cair-cair bertingkat menggunakan beberapa pelarut organik yang berbeda.

Partisi cair-cair memiliki beberapa keuntungan antara lain dapat memisahkan suatu golongan senyawa dalam sampel berdasarkan tingkat kepolarannya (Graham dan Rickwood, 1997).

2.4.2 Kromatografi

Kromatografi merupakan suatu prosedur pemisahan zat terlarut karena proses migrasi diferensial dinamis dalam sistem yang terdiri dari dua fase atau lebih, salah satu diantaranya bergerak secara berkesinambungan dalam arah

tertentu dan di dalamnya zat-zat itu menunjukkan perbedaan mobilitas disebabkan adanya perbedaan dalam adsorpsi, partisi, kelarutan, tekanan uap, ukuran molekul, atau kerapatan muatan ion. Prinsip dasar kromatografi adalah mengubah keadaan distribusi statik menjadi sistem kesetimbangan yang dinamik. Hal ini dilakukan dengan cara menggerakkan satu fase secara mekanis (fase gerak) relatif terhadap fase yang lainnya (fase diam) dalam suatu sistem kesetimbangan.

Senyawa yang memiliki afinitas lebih besar terhadap fase gerak (atau afinitas yang lebih kecil terhadap fase diam) akan bergerak lebih cepat daripada senyawa yang memiliki sifat sebaliknya. Perbedaan laju perpindahan ini merupakan dasar dari semua pemisahan secara kromatografi. Teknik kromatografi yang sering digunakan adalah kromatografi kertas, kromatografi lapis tipis, kromatografi gas-cair, dan kromatografi cair kerja tinggi (DepKes RI, 1995).

2.4.2.1 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis merupakan metode pemisahan campuran zat berdasarkan pada perbedaan kecepatan migrasi dari masing-masing komponen yang dipisahkan pada fase diam di bawah pengaruh fase gerak. Pemisahan terjadi selama perambatan kapiler (Harborne, 1987). Parameter utama dalam KLT adalah faktor retardasi (R_f) yaitu perbandingan antara jarak migrasi sampel dengan jarak migrasi fase gerak, yang dipengaruhi oleh:

1. fase diam
2. fase gerak
3. bejana pengembang
4. suhu
5. jarak pengembangan

6. kuantitas sampel

Analisis kualitatif dilakukan dengan menentukan nilai R_f (*Retardation factor*), dan warna noda. Setiap zat memiliki harga R_f yang spesifik dengan fase gerak dan fase diam tertentu (Skoog, 1981). Zat yang memiliki kepolaran yang sama dengan fase diam akan cenderung tertahan dan nilai R_f -nya paling kecil (Harborne, 1987).

$$R_f = \frac{\text{jarak tempuh noda komponen}}{\text{jarak tempuh fase gerak/eluen}}$$

Warna noda dapat dideteksi menggunakan digunakan sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm, serta penyemprotan hasil kromatografi dengan pereaksi warna.

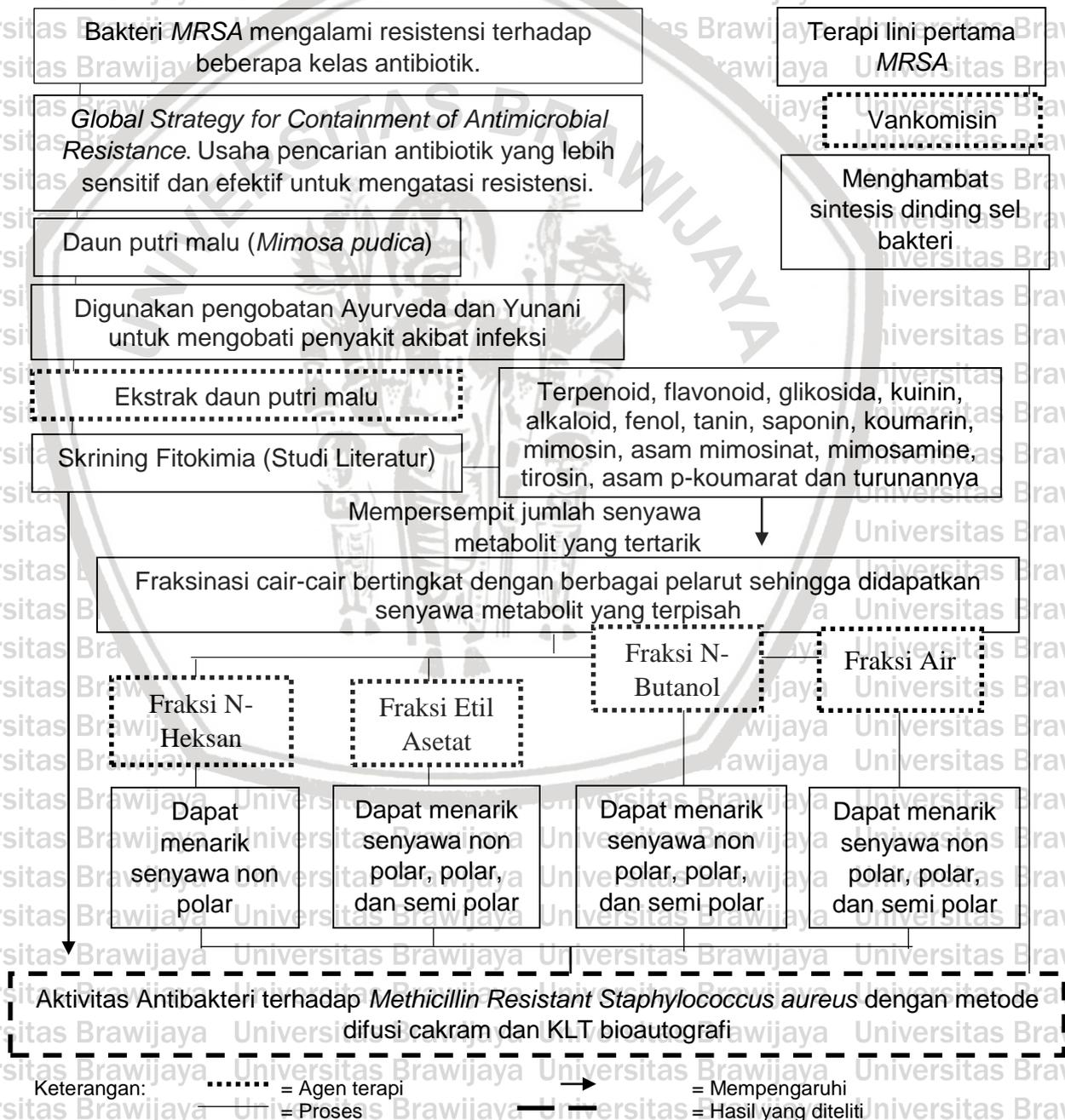
Tabel 2.4 Interpretasi Senyawa Metabolit dari Kromatografi Lapis Tipis

Senyawa Metabolit	Keterangan
Flavonoid (Markham, 2006)	Noda gelap pada sinar UV λ 254 nm, berwarna cokelat kekuningan pada cahaya tampak, dan berwarna kehijauan/kuning gelap/kebiruan pada sinar UV λ 366 nm.
Alkaloid (Dabendeti, 2009)	noda gelap pada sinar UV λ 254 nm dan akan berwarna keunguan/biru/biru kehijauan pada sinar UV λ 366 nm.
Tanin (Dabendeti, 2009)	Noda gelap pada sinar UV λ 254 nm, noda berwarna oranye pada sinar UV λ 366 nm.
Pigmen Klorofil (Sherma, 2003)	noda gelap pada sinar UV λ 254 nm dan akan berwarna kemerahan pada sinar UV λ 366 nm.
Furanokoumarin (Dinan, 2005)	noda gelap pada sinar UV λ 254 nm dan akan berwarna kekuningan pada sinar UV 366 nm.
Saponin (Glenks, 2005)	Noda gelap pada sinar UV λ 254 nm, noda berwarna keunguan pada sinar UV λ 366 nm setelah disemprot H_2SO_4 dan dipanaskan.

BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 3.1. Kerangka Konsep

3.1.1 Deskripsi Kerangka Konsep Penelitian

Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) merupakan salah satu bakteri patogen berjenis gram positif yang sering menyebabkan infeksi serius pada manusia. Menurut Sulistyarningsih (2010), prevalensi infeksi *MRSA* secara keseluruhan di Asia kini mencapai 70%, sementara di Indonesia, pada tahun 2006 prevalensinya mencapai angka 23,5%. Bakteri *MRSA* dilaporkan menunjukkan resistensi terhadap antibiotika isoxazolyl penicillin, dan beberapa antibiotika betalaktam, makrolida, aminoglikosida, tetrasiklin, kloramfenikol, dan kuinolon (Gnanamani *et al.*, 2017). Saat ini pengobatan satu-satunya yang dirasa efektif untuk mengobati infeksi *Methicillin Resisten Staphylococcus aureus* dapat dilakukan dengan pemberian antibiotika vankomisin (Harris *et al.*, 2017).

Banyaknya resistensi antibiotik terhadap bakteri membuat WHO meluncurkan suatu strategi yang disebut *Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance*. *Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance* merupakan strategi yang dikeluarkan oleh organisasi kesehatan dunia (WHO) sebagai upaya untuk mengatasi resistensi antimikroba. Untuk memecahkan permasalahan tersebut perlu dicari alternatif untuk memanfaatkan kembali bahan alam bagi kesehatan, khususnya dalam kasus pengendalian resistensi bakteri, mengingat Indonesia merupakan negara yang kaya akan bahan alam.

Salah satu tumbuhan yang diduga memiliki aktivitas sebagai antibakteri adalah *Mimosa pudica*. Penelitian sebelumnya yang dilakukan Sari dkk. (2015) melaporkan bahwa ekstrak etanol *Mimosa pudica* menunjukkan adanya aktivitas antibakteri terhadap mikroorganisme *Staphylococcus aureus* dan *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*. Skrining fitokimia awal ekstrak *Mimosa pudica*

menunjukkan adanya komponen bioaktif seperti steroid, flavonoid, glikosida, alkaloid, quinin, fenol, tanin, saponin dan koumarin. Aktivitas antibakteri dari tanaman diduga terdapat pada senyawa golongan flavonoid / polifenol, saponin, dan alkaloid (Gandhiraja *et al.*, 2009).

Penggunaan *Mimosa pudica* dalam bentuk ekstrak untuk kembangkan sebagai sediaan antibakteri nampaknya masih sulit untuk dilakukan. Hal tersebut dikarenakan dalam bentuk ekstrak, profil metabolit *Mimosa pudica* masih terlalu banyak sehingga sulit untuk dilakukan pengamatan mengenai aktivitas antibakteri dari tiap senyawa metabolitnya. Untuk itu perlu dilakukan suatu prosedur pemisahan kandungan metabolit *Mimosa pudica* berdasar karakteristiknya melalui metode fraksinasi (Graham dan Rickwood, 1997). Dalam melakukan fraksinasi digunakan empat macam pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda (etil asetat, n-heksan, n-butanol dan air), tujuannya adalah agar senyawa metabolit yang terpisah dapat berbeda-beda sesuai profil kepolarannya. Fraksi etil asetat merupakan fraksi yang diduga memiliki aktivitas sebanding dengan vankomisin karena merupakan pelarut semi polar pertama sehingga dapat menarik senyawa polar, semi polar, maupun non polar lebih banyak daripada fraksi lainnya. Ekstrak etanol dan fraksi *Mimosa pudica* tersebut juga perlu dilakukan pengujian untuk melihat profil metabolitnya, serta untuk mengetahui apakah aktivitas antibakteri senyawa dalam sampel memiliki aktivitas untuk menghambat pertumbuhan *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* melalui metode bioautografi.

Selanjutnya dilakukan perbandingan antara sampel ekstrak etanol dan fraksi *Mimosa pudica* dengan vankomisin yang dilakukan pada uji zona hambat menggunakan metode difusi menggunakan difusi cakram.

Vankomisin adalah antibiotik glikopeptida golongan aminoglikosida. Vankomisin bekerja dengan mekanisma menghambat sintesis dinding sel, mengubah permeabilitas membran sel, dan menghambat sintesis RNA bakteri gram positif (BPOM, 2017). Zona hambat yang terbentuk menunjukkan aktivitas antibakteri dari sampel ekstrak etanol dan fraksi ekstrak daun putri malu (*Mimosa pudica*) terhadap *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) secara *In Vitro*.

3.2 Hipotesis Penelitian

3.2.1 Ekstrak etanol daun putri malu (*Mimosa pudica*) dan fraksinya (fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, fraksi n-butanol, dan fraksi air) dari ekstrak etanol daun putri malu (*Mimosa pudica*) memiliki aktivitas antibakteri terhadap terhadap *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) secara *in vitro* dilihat dari diameter zona hambat yang terbentuk.

3.2.2 Fraksi etil asetat memiliki aktivitas antibakteri yang sebanding dengan antibiotik Vankomisin terhadap *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) secara *in vitro* dilihat dari diameter zona hambat yang terbentuk.

3.2.3 Semakin tinggi dosis ekstrak etanol daun putri malu (*Mimosa pudica*) dan fraksinya (fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, fraksi n-butanol, dan fraksi air), semakin tinggi efek antibakteri terhadap *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) secara *in vitro* dilihat dari diameter zona hambat yang terbentuk.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris dengan rancangan *True Experimental-Post Test Only Control Group Design*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek antibakteri ekstrak etanol daun putri malu (*Mimosa pudica*) dan fraksi ekstrak daun putri malu (*Mimosa pudica*) terhadap bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* secara *in vitro* dengan melihat zona hambat, serta melihat profil senyawa metabolit pada ekstrak dan fraksi berdasarkan hasil uji KLT - Bioautografi.

4.2 Sample Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* yang didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan RSUD Dr. Saiful Anwar, Malang, dengan tiga kode bakteri yang berbeda meliputi sampel yang diisolasi dari infeksi kulit, nanah, dan bukal.

4.3 Jumlah Pengulangan

Besarnya sampel yang diperlukan dalam penelitian ini dihitung melalui rumus :

$$t(n - 1) \geq 15$$

Keterangan :

t = Jumlah kelompok perlakuan

n = Jumlah pengulangan yang dibutuhkan pada tiap perlakuan (n harus bilangan bulat)

Dalam penelitian ini, peneliti menggunakan 7 kelompok perlakuan, sehingga didapatkan jumlah pengulangan sebagai berikut :

$$t(n - 1) \geq 15$$

$$7(n - 1) \geq 15$$

$$(7n - 7) \geq 15$$

$$7n \geq 22$$

$$n \geq 3,14285$$

Berdasarkan perhitungan diatas, maka dalam penelitian ini dilakukan 3 kali pengulangan.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas (Independent)

Variable bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanol 96% daun putri malu (*Mimosa pudica*), fraksi n-butanol, fraksi etil asetat, fraksi n-heksan, dan fraksi air daun putri malu (*Mimosa pudica*) dengan dosis 3 mg, 6 mg, 9 mg, 12 mg, 15 mg.

4.4.2 Variabel Tergantung (Dependent)

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah diameter zona hambat dan profil metabolit ekstrak etanol 96% daun putri malu (*Mimosa pudica*) dan fraksi n-heksan, etil asetat, n-butanol, dan air dari ekstrak etanol daun putri malu (*Mimosa pudica*).

4.4.3 Variabel Kontrol

Variabel kontrol positif yang digunakan pada penelitian ini adalah antibiotik vankomisin. Sedangkan variabel kontrol negatif yang digunakan dalam penelitian ini adalah DMSO 1%. Variabel lain yang diusahakan sama adalah suhu, media, waktu inkubasi, kondisi steril, dan kelembaban.

4.5 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang, dan Laboratorium Bahan Alam Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang, dengan waktu pelaksanaan pada bulan Juli 2017 - Maret 2018.

4.6 Alat dan Bahan Penelitian

4.6.1 Pembuatan Ekstrak Etanol 96% Daun Putri Malu

Alat yang digunakan meliputi tabung kaca untuk proses maserasi, *stirer* (IKA), oven, kertas saring, *stirer* (IKA), seperangkat *evaporator* evaporator vakum (IKA), corong buchner dengan vakum, cawan porselen, neraca analitik (METTLER TOLEDO), tabung *erlenmeyer* ukuran 400 ml (PYREX), *beaker glass* ukuran 250

ml (SCHOTT DURAN), *beaker glass* ukuran 500 ml (SCHOTT DURAN), gelas ukur 1 L (SCHOTT DURAN), stirer (IKA), sendok tanduk, spatel, sudip, aluminium foil, kulkas (TOSHIBA), dan botol steril untuk menampung hasil ekstrak.

Bahan yang digunakan meliputi serbuk kering daun putri malu (*Mimosa pudica*), etanol 96% (teknis), vaselin, dan akuades,

4.6.2 Pembuatan Fraksi Ekstrak Etanol Daun Putri Malu

Alat yang digunakan meliputi corong pisah, penyangga, oven (MEMMERT), *beaker glass* ukuran 250 ml (SCHOTT DURAN), seperangkat *rotary evaporator* vakum (IKA), corong buchner dengan vakum, cawan porselen, neraca analitik (METTLER TOLEDO), mortir, stampfer, sendok tanduk, spatel, sudip, aluminium foil, kulkas (TOSHIBA), dan botol steril untuk menampung hasil fraksinasi.

Bahan yang digunakan meliputi ekstrak etanol 96% daun putri malu, etil asetat (p.a), n-butanol (p.a), n-hexan (p.a), vaselin, dan akuades.

4.6.3 Optimasi dan Identifikasi Profil Metabolit dengan KLT

Alat yang digunakan meliputi plat silika GF 254 (MERCK), *UV lamp* (IKA), *chamber* eluasi (IKA), pipa kapiler, penggaris, pensil, pipet tetes, hot plate (IKA), *spray reagent*, dan *beaker glass* ukuran 250 ml (SCHOTT DURAN).

Bahan yang digunakan meliputi ekstrak etanol 96% daun putri malu, fraksi ekstrak etanol 96% daun putri malu, n-heksan (p.a), metanol (teknis), asam formiat (teknis), aseton (p.a), n-heksan (p.a), etil asetat (p.a), H₂SO₄ 10%, dan akuades.

4.6.4 Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat yang digunakan meliputi tabung reaksi (PYREX), *beaker glass* ukuran 250 ml (SCHOTT DURAN), rak tabung reaksi, cawan petri 10 cm, pinset, ose, autoclav, dan pembakar spiritus.

Bahan yang digunakan meliputi kapas, dan alkohol 70%.

4.6.5 Pembuatan Suspensi Bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus*

aureus

Alat yang digunakan meliputi ose, bunsen, tabung reaksi (PYREX), vortex (IKA), kapas steril, mikropipet (SOCOREX), Vitex, spektrofotometer, dan tip.

Bahan yang digunakan meliputi sampel bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*, *nutrient broth*, NaCl 0,9%, *nutrient agar*.

4.6.6 Identifikasi Bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*

Alat yang digunakan meliputi bunsen, korek api, ose, *cotton steril*, gelas objek, gelas penutup, spidol permanen (SNOWMAN), *papper disk* (OXOID), kertas penghisap, kertas berlatar hitam, vitex, mikroskop (OLYMPUS CX21).

Bahan yang digunakan meliputi biakan bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*, NA (Nutrient Agar), NB, MSA, MHA, H₂O₂, akuades steril, kit pewarnaan Gram (Kristal violet, lugol, alkohol 96%, safranin), media plasma, dan minyak emersi.

4.6.7 Pembuatan Larutan Uji

Alat yang digunakan meliputi neraca analitik (METTLER TOLEDO), sonikator (SONICA), *beaker glass* ukuran 250 ml (SCHOTT DURAN), mikro *tube*, pengaduk, mikropipet (SOCOREX), tip, tabung reaksi (PYREX), dan rak tabung reaksi.

Bahan yang digunakan meliputi ekstrak etanol 96% daun putri malu, fraksi ekstrak etanol 96% daun putri malu (fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, fraksi n-butanol, fraksi air), DMSO 1% dan akuades.

4.6.8 Pembuatan Cakram Uji

Alat yang digunakan meliputi mikropipet (SOCOREX), dan vial.

Bahan yang digunakan meliputi *paper disk* (OXOID), sampel ekstrak etanol 96%, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, fraksi n-butanol, dan fraksi air.

4.6.9 Penentuan Zona Hambat menggunakan Difusi Cakram

Alat yang digunakan meliputi cawan petri steril, pinset steril. Bahan yang digunakan meliputi *nutrient* agar padat yang telah diinokulasi bakteri, *paper disk* berisi sampel, vankomisin disk (OXOID).

4.6.10 Pengamatan dan Pengukuran

Alat yang digunakan meliputi mistar, dan tissue. Bahan yang digunakan meliputi air dan cawan petri berisi media pengamatan.

4.6.11 Bioautografi

Alat yang digunakan meliputi plat silika GF 254 (MERCK), *chamber* eluasi (IKA), cawan petri 10 cm, neraca analitik (METTLER TOLEDO), Pipet ukur 10 mL (PYREX), mikropipet (SOCOREX), *spray reagent*, pipet tetes, UV *lamp* (IKA), mistar berskala dan batang pengaduk.

Bahan yang digunakan meliputi suspensi bakteri, ekstrak etanol 96% daun putri malu, fraksi ekstrak etanol 96% daun putri malu (fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, fraksi n-butanol, fraksi air), metanol, reagen MTT, H₂SO₄ 10%, dan aquades.

4.7 Definisi Operasional

4.7.1 Bubuk kering daun putri malu (*Mimosa pudica*) yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari UPT Materia Medica Batu, Malang. Lokasi UPT Materia Medica ini berada pada ketinggian 875 meter di atas permukaan laut dengan curah hujan 256 mm/bulan, suhu rata-rata 23°C, dengan kelembaban sekitar 96%.

4.7.2 Ekstrak etanol 96% daun putri malu (*Mimosa pudica*) adalah hasil ekstraksi metode maserasi bubuk kering daun putri malu (*Mimosa pudica*) sebanyak 300 gram dengan menggunakan pelarut etanol teknis 96% sebanyak 3 liter, kemudian diremaserasi sebanyak dua kali dan dievaporasi dengan *vaccum rotary evaporator*, sehingga didapatkan konsentrasi awal ekstrak 100%.

4.7.3 Fraksi merupakan hasil dari proses fraksinasi / partisi.

4.7.4 Pada penelitian ini yang digunakan perlakuan ekstrak etanol 96%, serta fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, fraksi n-butanol, dan fraksi air dari ekstrak

etanol daun putri malu (*Mimosa pudica*) dalam berbagai dosis yaitu masing-masing 3 mg; 6 mg; 9 mg; 12 mg; dan 15 mg. Kontrol negatif yang digunakan adalah DMSO 1% dan kontrol positif yang digunakan adalah antibiotik vankomisin. Untuk masing-masing sampel, terdapat 5 kelompok perlakuan dan 2 kelompok kontrol, jadi jumlah total perlakuan adalah 7 kelompok perlakuan.

4.7.5 Rf atau faktor retensi yaitu nilai yang menyatakan derajat retensi suatu komponen fase diam. Nilai Rf sering digunakan sebagai nilai perbandingan relatif antar sampel dan dapat dijadikan acuan dalam mengidentifikasi sampel dengan cara membandingkan nilai Rf yang tidak diketahui dengan nilai Rf senyawa yang dikenal. $Rf = \text{jarak yang ditempuh oleh komponen} / \text{jarak yang ditempuh oleh permukaan larutan}$.

4.7.6 MRSA adalah singkatan dari *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*, merupakan salah satu strain dari bakteri *Staphylococcus aureus* yang resisten terhadap antibiotik Methicillin. Bakteri MRSA yang digunakan berasal dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan RSUD Dr. Saiful Anwar, Malang. Kode yang digunakan adalah bakteri MRSA yang diisolasi dari sampel infeksi pada kulit, sampel bukal, dan sampel nanah. Hasil uji sensitivitas didapatkan dari laboratorium mikrobiologi RSUD Dr. Saiful Anwar, Malang.

4.7.7 Zona hambat merupakan zona bening yang muncul disekitar sampel uji pada bakteri. Diameter zona hambatan pertumbuhan bakteri menunjukkan sensitivitas bakteri terhadap zat antibakteri, semakin lebar diameter zona tambatan yang terbentuk bakteri tersebut semakin sensitif.

4.7.8 Vankomisin merupakan antibiotik golongan glikopeptida yang bekerja dengan menghambat sintesis dinding sel.

4.8 Prosedur Penelitian

4.8.1 Pembuatan Ekstrak Etanol 96% Daun Putri Malu (*Mimosa pudica*)

4.8.1.1 Proses Ekstraksi

- a. Menimbang serbuk daun putri malu dengan total sebanyak 300 gram dengan timbangan analitik.
- b. Serbuk daun putri malu (300 gram) dimasukkan ke dalam toples kaca dan dicampurkan dengan etanol 96% sebanyak 3 liter, lalu diaduk dengan *stirer* kecepatan 400 rpm agar serbuk simplisia dan pelarut tercampur rata. Toples kaca kemudian diberi aluminium foil dan ditutup rapat.
- c. Campuran maserasi awal didiamkan dalam suhu ruang dan disimpan selama 1x24 jam.
- d. Setelah itu, dilakukan penyaringan menggunakan corong *buchner* untuk mendapatkan maserat. Hasil maserat kemudian ditampung dalam toples kaca yang lain. Ampas maserasi awal dimasukkan kembali ke toples awal.
- e. Maserasi dilakukan berulang sebanyak dua kali.
- f. Proses remaserasi pertama yakni mencampurkan ampas maserasi awal dengan etanol 96% sebanyak 3 liter dan disimpan selama 1x24 jam. Setelah satu hari, hasil maserat disaring kembali menggunakan corong *buchner* dan ditampung ke dalam toples kaca hasil maserat. Setelah itu, ulangi prosedur yang sama untuk proses remaserasi kedua.
- g. Hasil maserat ditampung dalam toples kaca untuk dilakukan proses evaporasi.

4.8.1.2 Proses Evaporasi

- a. Hasil maserat didalam toples kaca dimasukkan kedalam labu evaporasi.
- b. Memasang labu evaporasi pada evaporator.
- c. Menuangkan air pada *water bath* sampai penuh.
- d. Memasang semua rangkaian alat, dan diatur pada suhu 40°C dengan kecepatan 70 rpm.
- e. Menunggu hingga larutan etanol berhenti menetes pada labu penampung
- f. Hasil ekstraksi diletakkan dalam cawan porselen untuk ditimbang dan dicatat beratnya. Selanjutnya, ekstrak kental dikeringkan pada suhu $\pm 40^{\circ}\text{C}$ selama beberapa hari sampai mendapatkan hasil ekstrak yang lebih kental dan pekat.

4.8.2 Proses Fraksinasi Cair-Cair

Ekstrak etanol 96% daun putri malu difraksinasi dengan metode cair-cair.

Pelarut yang digunakan adalah n-heksan (teknis), etil asetat (teknis), n-butanol (teknis), dan air (aquades).

- a. Dirangkai corong pisah.
- b. Sebanyak 20 g ekstrak kering disuspensikan dalam aquadest 100 ml didalam *beaker glass* 250 ml.
- c. Pelarut n-heksan sebanyak 100 ml ditambahkan ke dalam suspensi air-ekstrak dalam corong pisah dan dikocok selama 5 menit hingga terpisah sempurna, kemudian diambil lapisan pelarut n-heksan.
- d. Kedalam residu ditambahkan n-heksan sebanyak 100 ml, lalu dikocok 5 menit, dan ditampung fase n-heksan.

- e. Prosedur tersebut diulangi hingga sembilan kali sehingga didapatkan fase n-heksan yang jernih.
- f. Residu yang telah terpisah ditambahkan etil asetat, kemudian dilakukan sesuai prosedur di atas. Etil asetat ditambahkan hingga fase etil asetat berwarna bening jernih (warna mulai konstan) sebanyak lima kali.
- g. Ditambahkan larutan n-butanol pada residu yang telah terpisah sebanyak 100 ml, dikocok selama 5 menit dan ditampung fase n-butanol sebanyak lima kali.
- h. Prosedur tersebut diulangi warna lapisan fase n-butanol mulai berwarna bening jernih (warna mulai konstan) sebanyak tujuh kali. Residu yang terakhir merupakan fase air.
- i. Masing masing fraksi (n-hexan, etil asetat, n-butanol, air) dipekatkan dengan vakum rotavapor dan dikeringkan dalam oven pada suhu 40°C.
- j. Setelah kering ditimbang berat masing-masing fraksi.

4.8.3 Optimasi dan Identifikasi profil metabolit dengan KLT

Terhadap tiap fraksi yang aktif sebagai antibakteri, dilakukan screening fitokimia dengan kromatografi lapis tipis menggunakan fase diam silika gel, fase gerak yang sesuai dengan berbagai perbandingan.

- a. Sebanyak 10 mg sampel dilarutkan dalam pelarut yang cocok, kemudian ditotolkan pada lempeng KLT (ukuran 10 cm x 5 cm x1 mm) secara memanjang (digariskan), dan dikeringkan.
- b. Selanjutnya lempeng dimasukkan dalam bejana pengembangan dan dilakukan optimasi dengan melakukan eluasi dengan trial fase gerak yang sesuai.

- c. Setelah eluasi selesai, lempeng KLT dikeringkan dan hasil eluasi ditandai, dan diamati menggunakan sinar UV pada panjang gelombang 366 nm, sinar UV pada panjang gelombang 254 nm, serta pengamatan pada cahaya tampak.

4.8.4 Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat yang akan disterilasi adalah alat-alat gelas yang digunakan untuk uji mikrobiologi, pinset, ose, cawan, kapas, dan spiritus.

- Menyiapkan alat gelas dan media yang akan digunakan.
- Disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.
- Ose dan pinset disterilkan dengan cara dibakar diatas api langsung.

4.8.5 Pembuatan Suspensi Bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) (10^6 CFU/ml)

Prosedur untuk memperoleh inkulum MRSA dengan konsentrasi 10^6 CFU/mL adalah sebagai berikut:

- Sampel bakteri MRSA yang telah terbukti melalui uji identifikasi diinkolusikan kedalam *Nutrient Broth* dengan cara mengambil koloni MRSA dari media NAP dengan menggunakan ose yang telah disterilkan dengan api bunsen kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi steril yang berisi *Nutrient Broth*. Tabung reaksi divortex hingga homogen, setelah itu diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
- Hasil suspensi bakteri yang telah diinkubasi dikeluarkan → diukur menggunakan spektrofotometri pada panjang gelombang 625 nm untuk

mengetahui kepadatan bakteri atau *Optical Density* (OD) dari suspensi.

Nilai OD yang diperoleh dicatat sebagai N_1 untuk rumus perhitungan yang akan dilakukan pada poin (c).

c. Mencari volume bakteri yang akan diambil dari tabung reaksi yang telah diperoleh nilai ODnya dengan perhitungan berikut:

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

$$\text{Nilai OD} \times V_1 = 0,1 \times V_2$$

$$V_1 = 0,1 \times V_2 / \text{nilai OD}$$

Keterangan :

V_1 = Volume bakteri yang akan ditambah dengan pengenceran (volume *Methicillin Resistant*

Staphylococcus aureus (MRSA) yang akan diambil dari tabung reaksi)

N_1 = Nilai OD hasil spektrofotometri (nilai absorbansi suspensi)

N_2 = Konsentrasi bakteri awal 0,1 yang setara dengan 10^8 CFU/mL

V_2 = Volume suspensi bakteri uji yang diharapkan (5 mL)

d. Dari hasil perhitungan poin (c), diambil volume bakteri sesuai hasil perhitungan, kemudian dimasukkan ke tabung reaksi steril lain yang masih kosong, kemudian ditambahkan larutan NaCl 0,9% steril ad volume tepat 5 mL. Tutup dengan kapas steril lalu divortex ad homogen. Diperoleh biakan cair dengan konsentrasi 1×10^8 CFU/mL.

e. Selanjutnya, suspensi bakteri dengan konsentrasi 1×10^8 CFU/mL tersebut diencerkan sampai konsentrasi 10^6 CFU/mL dengan cara menyiapkan tabung reaksi sebanyak 2 buah lalu pada tabung reaksi pertama dan kedua masing-masing diisi dengan larutan *Nutrient Agar* dengan volume 9 mL.

f. Suspensi *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) konsentrasi 1×10^7 CFU/mL diambil sebanyak 1 mL dengan mikropipet dari tabung reaksi kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi pertama yang telah

diisi 9 mL *Nutrient Agar*. Divortex hingga homogen. Konsentrasi sekarang menjadi 1×10^6 CFU/mL.

4.8.6 Identifikasi Bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA)

4.8.6.1 Pewarnaan Gram

Sebelum dilakukan uji konfirmasi, dilakukan pemurnian bakteri dengan melakukan penanaman bakteri yang diduga *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) pada media NAP dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Pewarnaan gram sering dilakukan untuk mengetahui sifat gram, kemurnian dan mengamati morfologi sel bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA). Prosedur pewarnaan gram menurut Dzen (2003) yaitu:

- a. Gelas objek dibersihkan dan disterilkan dengan memanaskan diatas nyala api spiritus.
- b. Sediaan apusan bakteri dibuat diatas gelas objek.
- c. Kristal violet ditetaskan hingga menutupi permukaan bakteri, dan didiamkan selama 1 menit. Kristal violet berfungsi sebagai pewarna dasar, selanjtnya kristal violet dibilas dengan air.
- d. Sediaan dituang dengan Lugol selama 1 menit, dan dibilas dengan air.
- e. Sediaan dituang dengan alkohol 90% selama 5-10 detik atau sampai warna cat luntur kemudian sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air
- f. Sediaan dituang dengan safranin selama 30 detik kemudian membuang sisa Safranin dan membilas dengan air. Safranin berfungsi sebagai pewarna pembanding.

g. Mengeringkan sediaan menggunakan kertas penghisap.

h. Dilihat di bawah mikroskop dengan lensa objektif perbesaran 100x.

Hasil : Apabila sel bakteri terwarnai keunguan maka dikelompokkan sebagai Gram positif, dan disebut Gram negatif apabila sel bakteri terwarnai warna merah.

4.8.6.2 Uji Koagulase

- Uji koagulase dilakukan dengan penyiapan media plasma sebanyak 1-2 tetes pada gelas objek.
- Dengan menggunakan ose bulat, koloni bakteri diambil dari media NA (*Nutrient Agar*) slant lalu dicampurkan dengan media plasma.
- Setelah itu, diamati langsung reaksi yang terjadi. Hasil dikatakan positif bila terjadi aglutinasi atau penggumpalan yang berarti bakteri tersebut mempunyai potensi menjadi patogen invasif.

4.8.6.3 Uji Katalase

- Sterilisasi alat dan bahan.
- Mengambil isolat dari NA (*Nutrient Agar*) menggunakan ose dan digoreskan pada *slide glass*.
- Ditambahkan larutan H_2O_2 , kemudian diamati, jika terdapat gelembung berarti positif yakni bakteri tersebut menghasilkan enzim katalase yang dapat menguraikan H_2O_2 . Begitu pula sebaliknya jika tidak terdapat gelembung berarti negatif yakni bakteri tersebut tidak menghasilkan enzim katalase yang dapat menguraikan H_2O_2 .

4.8.6.4 Identifikasi Bakteri dengan Media MSA (*Mannitol Salt Agar*)

- a. Sterilisasi alat dan bahan.
- b. Koloni bakteri dari media NA (*Nutrient Agar*) diambil dan digoreskan pada media MSA (*Mannitol Salt Agar*).
- c. Setelah itu diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam.
- d. Kemudian diperhatikan perubahan warna yang terjadi pada media. Apabila media berubah menjadi kuning, maka bakteri tersebut dapat tumbuh dalam suasana garam serta dapat memfermentasikan manitol. Perubahan warna pada media menandakan bakteri tersebut adalah *Staphylococcus aureus*.

4.8.6.5 Identifikasi Bakteri dan Uji Sensitivitas dengan Metode VITEK

- a. Sterilisasi alat dan bahan
- b. Disiapkan suspensi bakteri sebanyak 2 tabung untuk tiap kode bakteri
- c. Kekeruhan suspensi bakteri diukur menggunakan alat *Densitometer* hingga berada direntang 0,5 - 0,63 McFarland.
- d. Suspensi bakteri dipindahkan ke wadah yang disebut *cassette* dan dimasukkan kedalam alat bersama kartu Vitex yang sesuai untuk uji yang diinginkan (biru untuk identifikasi bakteri, abu-abu untuk uji sensitivitas).
- e. Data pasien diisikan pada software yang tersedia, dan proses identifikasi dijalankan.
- f. Hasil akan muncul pada software setelah proses identifikasi dan uji sensitivitas selesai.

(Pincus, 2014)

4.8.7 Pembuatan Larutan Uji

- a. Untuk kontrol positif : digunakan standar *paper disk* vankomisin.
- b. Untuk kontrol negatif : Pada *blank paper disk* diinjeksikan 10 μ L DMSO dengan konsentrasi 1 %.
- c. Untuk perlakuan :

Cek kelarutan:

1. Diambil 100 μ L DMSO dan ditambahkan 900 μ L aquades (konsentrasi 0,1%).
2. Ditimbang ekstrak / fraksi sebanyak 1 mg.
3. Dilarutkan dalam DMSO 1%.
4. Jika tidak larut dilakukan sonikasi selama 2 menit.
5. Apabila masih tidak larut, dibuat larutan DMSO dengan menaikkan konsentrasi hingga 50% dari konsentrasi awal.
6. Disaring dengan filter steril.

Pembuatan larutan uji untuk perlakuan:

1. Disiapkan fraksi dan ekstrak daun putri malu (*Mimosa pudica*) konsentrasi 100%.
2. Ditimbang fraksi dan ekstrak daun putri malu sebanyak 500 mg.
3. Dilarutkan dalam 1 mL DMSO 1% sehingga didapatkan konsentrasi menjadi 500 mg/mL. Dilakukan pengenceran bertingkat sehingga didapatkan konsentrasi larutan uji 400 mg/mL, 300 mg/mL, 200 mg/mL, dan 100 mg/mL.
 - 500 mg/ml sampel diambil 0,8 ml ditambah dengan 0,2 ml DMSO 1% sehingga konsentrasi menjadi 400 mg/ml.

- 400 mg/ml sampel diambil 0,75 ml ditambah dengan 0,25 ml DMSO 1% sehingga konsentrasi menjadi 300 mg/ml.
- 300 mg/ml sampel diambil 0,67 ml ditambah dengan 0,33 ml DMSO 1% sehingga konsentrasi menjadi 200 mg/ml.
- 200 mg/ml sampel diambil 0,5 ml ditambah dengan 0,5 ml DMSO 1% sehingga konsentrasi menjadi 100 mg/ml.

4. Disaring menggunakan filter steril.

4.8.8 Pembuatan Cakram Uji

- a. Disiapkan alat dan bahan yang telah disterilkan.
- b. Larutan uji (konsentrasi 100 mg/ml, 200 mg/ml, 300 mg/ml, 400 mg/ml, dan 500 mg/ml) dengan volume 30µL dimasukkan pada masing-masing *blank paper disk* dengan menggunakan mikropipet. Apabila dikonversikan dengan volume cakram kosong maka dosis secara berurutan yaitu 3 mg, 6 mg, 9 mg, 12 mg, dan 15 mg untuk tiap disk.
- c. *Paper disk* yang telah berisi larutan uji dikeringkan menggunakan oven pada suhu 40°C.

4.8.9 Penentuan Zona Hambat dengan Metode Difusi Cakram

- a. *Muller Hinton Agar* digunakan dalam teknik difusi cakram dimana *MRSA* diinokulasikan menggunakan sapu kapas steril dan kemudian cakram berisi ekstrak dan fraksinya ditempatkan dengan jarak yang sama di dalam *plate agar* yang telah diinokulasi dengan *MRSA*. Cakram kontrol

pembanding mengandung vankomisin (30 µg) sedangkan cakram kontrol negatif berisikan DMSO1%.

- b. Cawan petri diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Diameter zona hambat yang terbentuk diukur dalam milimeter dan rata-rata ditentukan.
- c. Dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Dan dihitung rata-rata diameter zona hambat yang terbentuk.

4.8.10 Pengamatan dan Pengukuran

- a. Pengamatan dilakukan setelah 1x24 jam masa inkubasi.
- b. Daerah bening merupakan petunjuk kepekaan bakteri terhadap antibiotik atau bahan antibakteri lainnya yang digunakan sebagai bahan uji yang dinyatakan dengan lebar diameter zona hambat. Diameter zona hambat diukur dalam satuan milimeter (mm) menggunakan mistar berskala.

4.8.11 Bioautografi

Uji Aktivitas Antibakteri dengan Metode KLT-Bioautografi

- a. Sebanyak 10 mg untuk masing-masing sampel ditimbang dan dilarutkan dalam 0,5 mL metanol.
- b. Sebanyak 5 µl larutan sampel ditotolkan pada plat KLT berukuran 2 cm x 8,7 cm sehingga dosis yang ditotolkan sebesar 100 µg tiap sampelnya, dielusi dalam *chamber* dengan fase gerak yang sesuai (hasil optimasi)

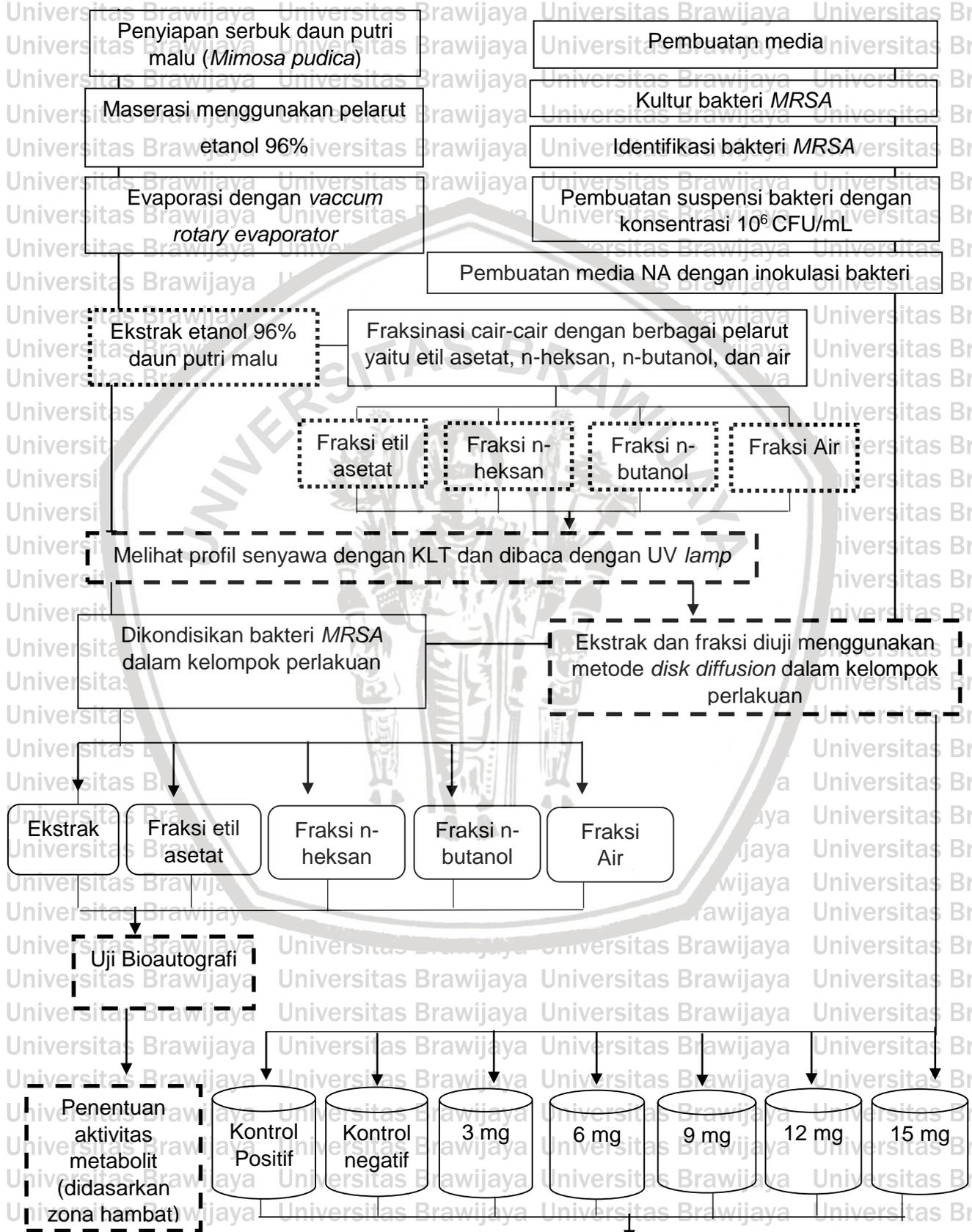
yaitu:

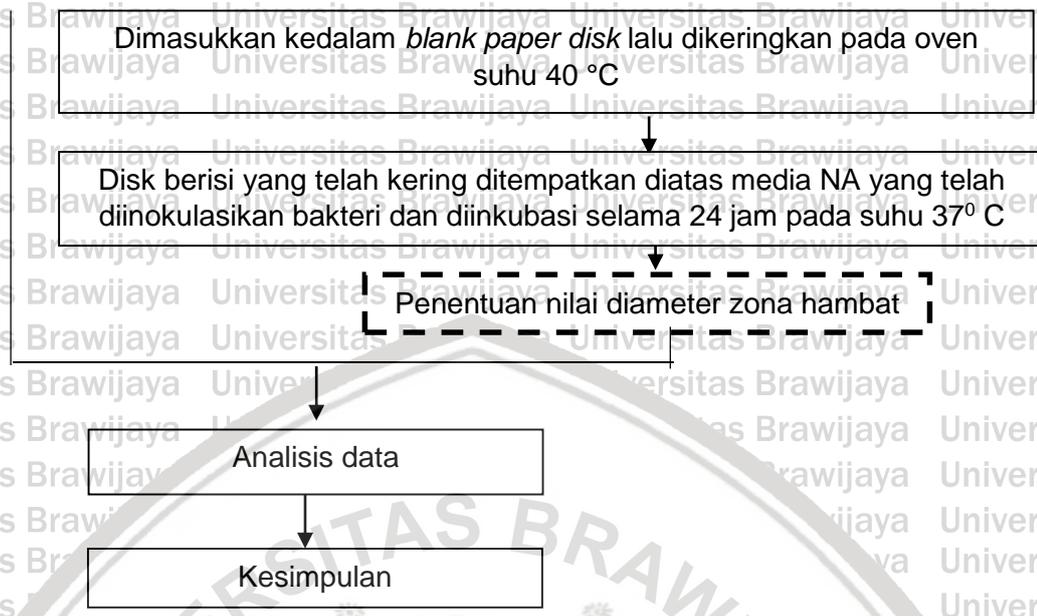
- Kloroform: aseton: asam formiat (2:7,5:0,5) untuk ekstrak etanol dan fraksi n-butanol dari ekstrak etanol 96% daun putri malu (*Mimosa pudica*).
 - Kloroform: metanol (8:2) untuk fraksi n-heksan dari ekstrak etanol 96% daun putri malu (*Mimosa pudica*).
 - Etil asetat: n-heksan (4:6) untuk fraksi etil asetat dari ekstrak etanol 96% daun putri malu (*Mimosa pudica*).
 - Kloroform: aseton: asam formiat (2:7:1) untuk fraksi air fraksi etil asetat dari ekstrak etanol 96% daun putri malu (*Mimosa pudica*).
- c. Plat KLT diangin-anginkan pada lemari asam atau di keringkan menggunakan *hairdryer*.
 - d. Plat KLT dicelupkan ke dalam suspensi bakteri *MRSA* dengan konsentrasi 1×10^6 CFU.
 - e. Bioautogram kemudian diinkubasi pada suhu 25°C selama 48 jam dalam kondisi lembab. Untuk visualisasi pertumbuhan mikroba digunakan garam tetrazolium (MTT 0,05%), dan disemprotkan ke bioautogram dan diinkubasi kembali pada 25°C selama 24 jam atau pada suhu 37°C selama 3-4 jam.
 - f. Zona putih yang jernih dengan latar belakang keruh atau keunguan pada pelat KLT menunjukkan aktivitas antimikroba sampel.
 - g. Dihitung nilai R_f dari masing-masing zona hambat dan dibandingkan dengan R_f pada plat KLT pembanding yang telah disemprot dengan H_2SO_4 10%.

4.9 Analisis Data

Analisis data yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi cakram menggunakan metode Two Way ANOVA + *Post Hoc* apabila data berdistribusi normal, pada taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Uji statistik Two Way ANOVA dilakukan untuk melihat adanya perbedaan bermakna atau tidak antara perbedaan konsentrasi dan sampel uji dalam menghambat aktivitas bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA)* secara *in vitro*. Sebelum dilakukan uji Two Way ANOVA terdapat beberapa persyaratan yaitu data harus berdistribusi normal yang dapat diketahui dengan menggunakan uji Kolmogorov Smirnov, varian antar variabel percobaan harus homogen dengan pengujian menggunakan uji Levene. Apabila data tidak memenuhi persyaratan parametrik, maka dilakukan uji statistik non parametrik menggunakan uji Friedman disertai dengan uji Wilcoxon untuk analisa *post hoc*. Aktivitas antibakteri secara *in vitro* dari sampel uji dapat diketahui dari nilai diameter zona hambat yang terbentuk. Untuk metode analisis bioautografi menggunakan analisa secara kualitatif dengan melihat ada tidaknya zona hambat pada tiap spot hasil eluasi KLT.

4.10 Alur Penelitian





- Keterangan:
- = Agen terapi
 - = Mempengaruhi
 - = Proses
 - = Hasil yang diteliti

Gambar 4.1. Alur Penelitian



BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Ekstraksi

Ekstraksi 300 gram serbuk kering daun putri malu yang menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 3 liter, menghasilkan ekstrak kental dengan karakteristik berbentuk pasta, berwarna coklat tua kehijauan, dan berbau khas aromatik dengan massa 36,3783 gram. Berdasarkan hasil perhitungan didapatkan rendamen sebesar 12,1216%.

5.2 Fraksinasi

Fraksinasi cair-cair bertingkat dilakukan dengan menggunakan pelarut n-hexsan, etil asetat, n-butanol, dan akuades secara berurutan. Total volume tiap pelarut dan massa fraksi kental dari proses fraksinasi masing-masing pelarut terdapat pada **Tabel 5.1**.

Tabel 5.1 Proses Fraksinasi dan Massa Fraksi Kental

Jenis Fraksi	Volume Total Pelarut	Massa Total	Rendamen	Karakteristik Fraksi
N-Hexane	900 mL	2,2992 gram	11,496%	Warna: Hijau Kehitaman Bau: Khas Aromatik Konsistensi: Pasta
Etil Asetat	500 mL	2,2830 gram	6,415%	Warna: Hijau Kehitaman Bau: Khas Aromatik Konsistensi: Pasta
N-Butanol	700 mL	3,6880 gram	18,44%	Warna: Coklat Tua Kehitaman Bau: Khas Aromatik Konsistensi: Pasta
Air	100 mL	5,1227 gram	5,1227%	Warna: Coklat Bau: Khas Aromatik Konsistensi: Serbuk Bergumpal

Berdasarkan tabel tersebut, dapat dilihat jika fraksi air merupakan fraksi yang paling banyak didapatkan dibandingkan fraksi yang lain dengan massa fraksi kental sebesar 5,1227 gram.

5.3 Optimasi Fase Gerak KLT

Optimasi fase gerak dilakukan dengan menggunakan fase diam silika GF_{254 nm}. Deteksi noda hasil eluasi dilakukan menggunakan sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Setelah eluasi plat KLT disemprot menggunakan H₂SO₄ 10% untuk selanjutnya noda hasil eluasi dideteksi kembali pada cahaya tampak, dan sinar UV pada panjang gelombang 366 nm. Digunakan sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm karena dianggap mewakili pendek (190 nm - 280 nm) dan digunakan sinar UV dengan panjang gelombang 366 nm karena dianggap mewakili panjang (280 nm - 380 nm). Hasil keseluruhan pengujian optimasi fase gerak, nilai R_f, warna masing-masing spot serta interpretasi senyawa metabolit yang tertarik untuk masing-masing sampel dan fase gerak dapat dilihat pada **Lampiran 6**. Berdasarkan hasil optimasi dengan berbagai macam fase gerak di atas dilihat dari jumlah spot yang tereluasi, pemisahan spot yang baik, dan ketajaman spot untuk masing-masing sampel, maka fase gerak yang dapat memisahkan spot-spot dari masing-masing sampel ekstrak etanol dan fraksinya dengan baik dapat dilihat pada **Tabel 5.2**.

Tabel 5.2 Fase Gerak Hasil Optimasi untuk Ekstrak Etanol Daun Putri Malu (*Mimosa pudica*) dan Fraksinya

Sampel	Fase Gerak	Perbandingan
Ekstrak	Kloroform:aseton:asam formiat	2 : 7,5 : 0,5
Fraksi N-heksan	Kloroform:metanol	8 : 2
Fraksi Etil Asetat	Etil asetat:n-heksan	4 : 6
Fraksi N-butanol	Kloroform:aseton:asam formiat	2 : 7,5 : 0,5
Fraksi Air	Kloroform:aseton:asam formiat	2 : 7 : 1

5.4 Optimasi Konsentrasi dengan Metode Difusi Cakram

Optimasi dilakukan dengan beberapa serial konsentrasi. Serial konsentrasi pertama meliputi konsentrasi 40 µg/ml, 80 µg/ml, 160 µg/ml, dan 320 µg/ml, dan serial konsentrasi kedua meliputi konsentrasi 25 mg/ml, 50 mg/ml, 100 mg/ml, dan 200 mg/ml. Sampel dengan dua serial konsentrasi tersebut kemudian diujikan pada bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* dengan metode difusi cakram. Hasil optimasi konsentrasi uji dengan metode difusi cakram dapat dilihat pada Tabel 5.3.

Tabel 5.3 Diameter Zona Hambat Ekstrak Etanol Daun Putri Malu (*Mimosa pudica*) pada Optimasi Konsentrasi Uji menggunakan Metode Difusi Cakram (mm)

Dosis	Ekstrak
Serial 1	
40 µg/ml	0
80 µg/ml	0
160 µg/ml	0
320 µg/ml	0
Serial 2	
25 mg/ml	0
50 mg/ml	0
100 mg/ml	9
200 mg/ml	10
Kontrol Positif (Vankomisin)	18
Kontrol Negatif (DMSO 1%)	0

Berdasarkan hasil optimasi konsentrasi tersebut diketahui jika konsentrasi sampel ekstrak etanol daun putri malu yang memiliki efek menghambat bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*, terdapat pada konsentrasi 200 mg/ml dan 100 mg/ml dengan zona hambat berdiameter 1 cm dan 0,9 cm.

5.5 Uji Aktivitas Antibakteri pada MRSA dengan Metode Difusi Cakram

Uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi cakram dilakukan sebanyak tiga kali pengujian menggunakan bakteri MRSA yang berasal dari tiga pasien yang berbeda. Adapun uji aktivitas antibakteri ini menggunakan dosis 3 mg, 6 mg, 9 mg, 12 mg, dan 15 mg, serta kontrol positif menggunakan *paper disk* standar vankomisin 30 µg, dan kontrol negatif berupa DMSO 1%. Hasil uji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi cakram dapat dilihat pada **Tabel 5.5**.

Tabel 5.4 Diameter Zona Hambat Ekstrak Etanol Daun Putri Malu (*Mimosa pudica*) dan Fraksinya menggunakan Metode Difusi Cakram (mm)

	n	Zona Hambat (mm)					K-	K+ (Vankomisin 30 µg)
		3 mg	6 mg	9 mg	12 mg	15 mg		
Ekstrak Etanol	1	10	12	13	14	15	0	18
	2	0	11	12	13	14	0	18
	3	0	9	10	11	13	0	19
	Rerata	3,33 ± 5,774	10,67 ± 1,528	11,67 ± 1,528	12,67 ± 1,528	14 ± 1,000	0	18,33 ± 0,577
Fraksi N- Heksan	1	8	10	11	12	13	0	18
	2	0	0	0	0	8	0	18
	3	0	0	0	0	7	0	19
	Rerata	2,67 ± 4,619	3,33 ± 5,774	3,67 ± 6,351	4 ± 6,928	9,33 ± 3,215	0	18,33 ± 0,577
Fraksi Etil Asetat	1	11	13	15	16	18	0	18
	2	15	16	17	18	20	0	18
	3	15	16	17	18	20	0	19
	Rerata	13,67 ± 2,309	15 ± 1,732	16,33 ± 1,155	17,33 ± 1,155	19,33 ± 1,155	0	18,33 ± 0,577
Fraksi N- Butanol	1	6,5	7	8	9	10	0	18
	2	0	10	11	12	13	0	18
	3	0	9	10	11	12	0	19
	Rerata	2,17 ± 3,753	8,67 ± 1,528	9,67 ± 1,528	10,67 ± 1,528	12,67 ± 1,528	0	18,33 ± 0,577
Fraksi Air	1	0	9	12	13	14	0	18
	2	0	10	11	12	13	0	18
	3	0	10	12	13	14	0	19
	Rerata	0 ± 0,000	9,67 ± 0,577	11,67 ± 0,577	12,67 ± 0,577	13,67 ± 0,577	0	18,33 ± 0,577

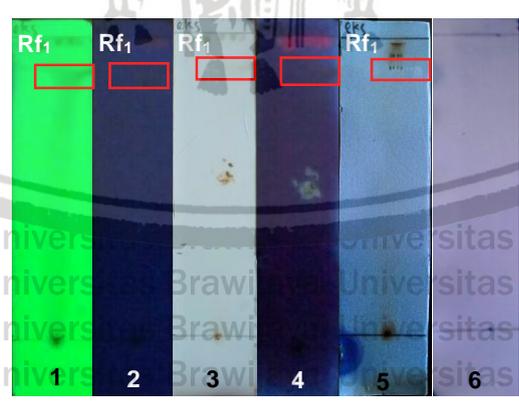
Keterangan : K- = kontrol negatif (DMSO 1%), K+ Kontrol Positif (Vankomisin)

Berdasarkan hasil uji tersebut diketahui tidak terdapat zona hambat pada kontrol negatif dan sampel fraksi air dengan dosis 3 mg pada ketiga replikasi uji. Hasil uji sampel ekstrak dan n-butanol menunjukkan bahwa pada hasil uji kedua dan uji ketiga pada dosis 3 mg tidak menunjukkan zona hambat. Sedangkan pada sampel n-heksan hasil uji menunjukkan bahwa tidak terdapat zona hambat saat

dilakukan uji kedua dan ketiga pada dosis 3 mg, 6 mg, 9 mg, dan 12 mg. Rata-rata zona hambat terbesar dimiliki oleh sampel fraksi etil asetat, sedangkan rata-rata zona hambat terkecil dimiliki oleh sampel n-heksan. Untuk kontrol positif menggunakan antibiotik vankomisin memberi zona hambat yang berbeda pada kode bakteri yang berbeda.

5.6 Uji KLT-Bioautografi

Uji KLT – Bioautografi dilakukan dengan terlebih dahulu melakukan eluasi tiap sampel pada plat kromatogram yang telah disiapkan. Tiap sampel masing-masing ditotolkan pada dua plat KLT (satu plat uji untuk identifikasi profil metabolit, dan satu plat uji untuk uji bioautografi). Berdasarkan data hasil uji KLT-bioautografi sampel ekstrak etanol daun putri malu dan fraksinya terhadap bakteri *MRSA*, diketahui bahwa pada sampel ekstrak etanol, sampel fraksi n-heksan, sampel fraksi etil asetat, dan sampel fraksi n-butanol memiliki zona hambatan pada spot tertentu yang ditandai dengan warna putih samar pada lempeng KLT setelah disemprot dengan reagen MTT 0,05%,



Gambar 5.1 Uji KLT-Bioautografi Sampel Ekstrak Etanol 96%

(Keterangan: 1= KLT pembanding dibawah sinar UV λ 254 nm, 2= KLT pembanding dibawah sinar UV λ 366 nm (sebelum disemprot H_2SO_4), 3= KLT pembanding dibawah cahaya tampak, 4= KLT pembanding dibawah sinar UV λ 366 nm (sesudah disemprot H_2SO_4), 5= Hasil KLT Bioautografi pada cahaya tampak, 6= Kontrol fase gerak)

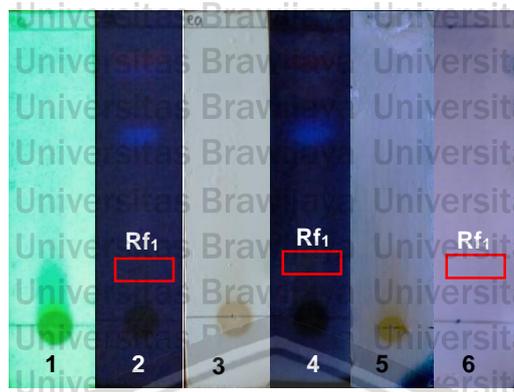
Berdasarkan hasil pengujian menggunakan sampel ekstrak diketahui bahwa terdapat satu spot yang terletak pada $R_f = 0,857$. Hasil KLT pembanding menunjukkan bahwa pada spot tersebut berwarna hijau kehitaman pada pengamatan menggunakan sinar UV λ 254 nm, menunjukkan kehijauan pada pengamatan menggunakan sinar UV λ 366 nm (sebelum dan sesudah disemprot H_2SO_4), dan menunjukkan warna kecoklatan pada cahaya tampak setelah disemprot H_2SO_4 . Untuk hasil pengamatan pada plat KLT kontrol diketahui tidak terdapat zona hambat.



Gambar 5.2 Uji KLT-Bioautografi Sampel Fraksi N-Heksan

(Keterangan: 1= KLT pembanding dibawah sinar UV λ 254 nm, 2= KLT pembanding dibawah sinar UV λ 366 nm (sebelum disemprot H_2SO_4), 3= KLT pembanding dibawah cahaya tampak, 4= KLT pembanding dibawah sinar UV λ 366 nm (sesudah disemprot H_2SO_4), 5= Hasil KLT Bioautografi pada cahaya tampak, 6= Kontrol fase gerak)

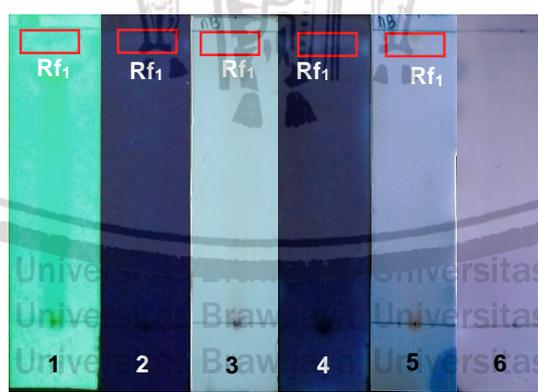
Untuk pengamatan pada sampel fraksi n-heksan diketahui terdapat zona hambat pada $R_f = 0,814$. Hasil pengamatan pada KLT pembanding menunjukkan jika spot tersebut memiliki warna hijau kehitaman pada pengamatan menggunakan sinar UV λ 254 nm, menunjukkan warna kemerahan pada pengamatan menggunakan sinar UV λ 366 nm (sebelum dan sesudah disemprot H_2SO_4), dan menunjukkan warna kuning kehijauan pada cahaya tampak setelah disemprot H_2SO_4 . Untuk hasil pengamatan pada plat KLT kontrol diketahui tidak terdapat zona hambat.



Gambar 5.3 Uji KLT-Bioautografi Sampel Fraksi Etil Asetat

(Keterangan: 1= KLT pembanding dibawah sinar UV λ 254 nm, 2= KLT pembanding dibawah sinar UV λ 366 nm (sebelum disemprot H_2SO_4), 3= KLT pembanding dibawah cahaya tampak, 4= KLT pembanding dibawah sinar UV λ 366 nm (sesudah disemprot H_2SO_4), 5= Hasil KLT Bioautografi pada cahaya tampak, 6= Kontrol fase gerak)

Hasil pengamatan pada sampel fraksi etil asetat diketahui terdapat zona hambat pada $R_f = 0,329$. Hasil pengamatan pada KLT pembanding menunjukkan jika spot tersebut tidak terlihat pada sinar UV λ 254 nm dan cahaya tampak setelah disemprot H_2SO_4 , namun spot tersebut menunjukkan warna keunguan pada pengamatan menggunakan sinar UV λ 366 nm (baik sebelum disemprot H_2SO_4 ataupun setelah disemprot H_2SO_4). Untuk hasil pengamatan pada plat KLT kontrol diketahui tidak terdapat zona hambat.



Gambar 5.4 Uji KLT-Bioautografi Sampel Fraksi N-Butanol

(Keterangan: 1= KLT pembanding dibawah sinar UV λ 254 nm, 2= KLT pembanding dibawah sinar UV λ 366 nm (sebelum disemprot H_2SO_4), 3= KLT pembanding dibawah cahaya tampak, 4= KLT pembanding dibawah sinar UV λ 366 nm (sesudah disemprot H_2SO_4), 5= Hasil KLT Bioautografi pada cahaya tampak, 6= Kontrol fase gerak)

Hasil pengamatan pada sampel fraksi n-butanol diketahui terdapat zona hambat pada $R_f = 0,971$. Hasil pengamatan pada KLT menunjukkan jika spot tersebut memiliki warna hijau kehitaman pada pengamatan menggunakan sinar UV λ 254 nm, menunjukkan warna kebiruan pada pengamatan menggunakan sinar UV λ 366 nm, menunjukkan warna kecoklatan pada cahaya tampak setelah disemprot H_2SO_4 , serta menunjukkan warna hijau kebiruan pada pengamatan menggunakan sinar UV λ 366 nm (setelah pemanasan). Untuk hasil pengamatan pada plat KLT kontrol diketahui tidak terdapat zona hambat.



Gambar 5.5 Uji KLT-Bioautografi Sampel Fraksi Air

(Keterangan: 1= KLT pembanding dibawah sinar UV λ 254 nm, 2= KLT pembanding dibawah sinar UV λ 366 nm (sebelum disemprot H_2SO_4), 3= KLT pembanding dibawah cahaya tampak, 4= KLT pembanding dibawah sinar UV λ 366 nm (sesudah disemprot H_2SO_4), 5= Hasil KLT Bioautografi pada cahaya tampak, 6= Kontrol fase gerak)

Berdasarkan hasil KLT bioautografi pada sampel fraksi air diketahui tidak terdapat adanya zona hambatan pada hasil KLT bioautografi sampel fraksi air dan KLT bioautografi kontrol (fase gerak).

Tabel 5.5 Rf Spot Hasil KLT Bioautografi pada bakteri MRSA

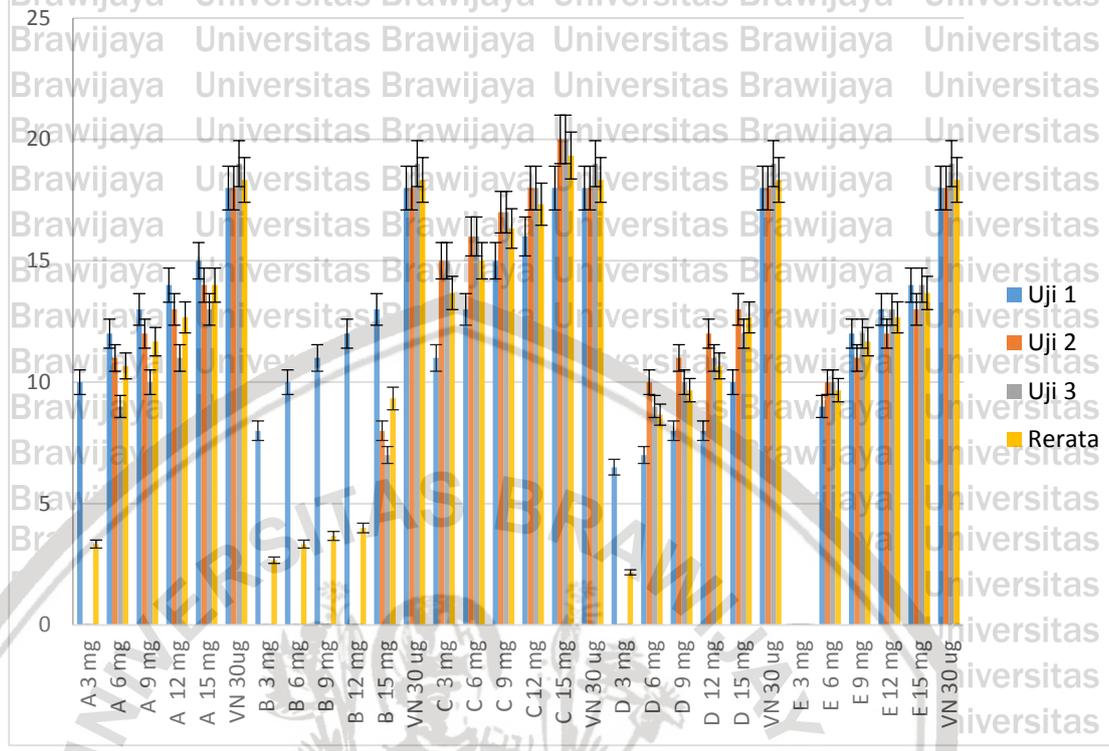
Sampel	KLT Bioautografi		Warna Spot KLT Pemanding				Interpretasi
			Sebelum disemprot H ₂ SO ₄		Setelah disemprot H ₂ SO ₄		
	Rf	Warna	254 nm	366 nm	Cahaya Tampak	366 nm	
Ekstrak	0,857	Putih Samar	Hijau Kehitaman	Kehijauan	Kecoklatan	Kehijauan	Flavonoid
Fraksi n-heksan	0,814	Putih Samar	Hijau Kehitaman	Kemerahan	Kuning Kehijauan	Kemerahan	Pigmen Klorofil
Fraksi Etil Asetat	0,329	Putih Samar	-	Keunguan	-	Keunguan	Alkaloid atau saponin
Fraksi n-butanol	0,971	Putih Samar disekitar Spot Coklat	Hijau Kehitaman	Kebiruan	Kecoklatan	Hijau Kebiruan	Flavonoid
Fraksi Air	-	-	-	-	-	-	-

5.7 Analisis Data

Analisis data statistik yang digunakan adalah uji non parametrik Friedman disertai uji Wilcoxon untuk analisa *post hoc*. Berdasarkan uji non parametrik Friedman diperoleh $p=0,000$ ($p<0,05$), sedangkan untuk uji Wilcoxon didapatkan hasil untuk nilai signifikansi perbandingan keseluruhan sampel uji (ekstrak etanol 96%, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, fraksi n-butanol, dan fraksi air) pada dosis 3 mg, 6 mg, 9 mg, 12 mg, dan 15 mg serta kontrol positif vankomisin, diketahui bahwa hasil signifikansi perbandingan antar sampel dengan dosis tertentu seluruhnya menunjukkan nilai signifikansi lebih dari 0,05 (**Lampiran 14**).

Selain menggunakan analisis statistik, data digambarkan dalam bentuk grafik untuk melihat pengaruh dosis terhadap zona hambat dari tiap sampel.

Berikut adalah grafik yang menunjukkan pengaruh serial dosis pada sampel ekstrak etanol 96% daun putri malu beserta fraksinya terhadap rerata diameter zona hambat yang terbentuk.



Gambar 5.13 Pengaruh Serial Dosis pada Ekstrak Etanol Daun Putri Malu dan Fraksinya serta Kontrol Positif Vankomisin terhadap Rerata Diameter Zona Hambat menggunakan Metode Difusi Cakram

Keterangan: A= Ekstrak Etanol 96%, B= Fraksi N-Heksan, C= Fraksi Etil Asetat, D= Fraksi N-Butanol, E= Fraksi Air, VN= Vankomisin

Grafik data tersebut menunjukkan bahwa seluruh sampel uji baik ekstrak etanol 96% daun putri malu dan fraksinya memiliki aktivitas menghambat pertumbuhan bakteri *MRSA*. Sampel ekstrak etanol 96%, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi etanol diketahui sudah mulai menunjukkan aktivitas antibakteri pada dosis 3 mg yang ditandai dengan adanya zona hambat. Sampel fraksi air mulai menunjukkan aktivitas antibakteri pada dosis 6 mg yang ditandai dengan munculnya zona hambat. Berdasarkan hasil penelitian diketahui jika fraksi etil asetat memiliki aktivitas antibakteri paling sedangkan fraksi n-heksan menunjukkan aktivitas antibakteri terendah.

BAB 6 PEMBAHASAN

6.1 Ekstraksi dan Fraksinasi

Ekstrak kental yang didapatkan pada penelitian ini memiliki karakteristik berbentuk pasta, berwarna coklat tua kehijauan, berbau khas aromatik, dan berasa pahit. Karakteristik ekstrak tersebut sesuai dengan penelitian pendahuluan yang dilakukan oleh Sumiwi (2013) yang menunjukkan karakteristik ekstrak berbentuk pasta, berwarna kecoklatan hingga kehijauan, dan berbau khas aromatik. Adapun karakteristik ekstrak ini dipengaruhi oleh jenis pelarut dan konsentrasi pelarut yang digunakan. Pelarut yang digunakan dalam metode ekstraksi ini menggunakan pelarut etanol 96%. Menurut Yulianti (2014), ekstrak yang didapatkan dari prosedur ekstraksi menggunakan pelarut etanol 96% memiliki ketahanan yang lebih tinggi dan waktu evaporasi yang lebih rendah dibandingkan menggunakan pelarut etanol 80 % karena kadar air yang dimiliki lebih rendah. Penggunaan pelarut etanol 96% juga mempengaruhi karakteristik ekstrak yang dihasilkan.

Ekstrak yang dihasilkan dari proses ekstraksi menggunakan pelarut etanol 96% dilaporkan memiliki viskositas yang lebih tinggi daripada pelarut etanol 80%.

Menurut Bourne (1982), viskositas tersebut dipengaruhi oleh komponen terlarut, semakin besar komponen terlarut tersebut maka semakin tinggi viskositasnya.

Berdasarkan hasil penelitian didapatkan rendamen sebesar 12,1261%. Besar kecilnya rendemen sering dikaitkan dengan keefektifan proses ekstraksi dan

pelarut yang digunakan. Penggunaan remaserasi bertujuan untuk meningkatkan rendaman yang diperoleh dibandingkan dengan maserasi saja (Azwanida, 2015).

Fraksinasi dilakukan dengan menggunakan metode fraksinasi bertingkat menggunakan empat jenis pelarut yang berbeda. Proses fraksinasi dimulai dengan menggunakan pelarut yang kurang polar menuju pelarut yang lebih polar secara bertingkat, dimulai dari pelarut n-heksan (non polar), etil asetat (semi polar), n-butanol (semi polar), dan air (polar). Derajat kepolaran didasarkan pada konstanta dielektrik dari pelarut tersebut, dimana semakin besar konstanta dielektrik maka pelarut tersebut semakin polar (Soegiharjo, 2013). Urutan penggunaan pelarut dimulai dari pelarut non polar terlebih dahulu dikarenakan agar senyawa non polar terpisah terlebih dahulu dari ekstrak. Apabila digunakan pelarut polar terlebih dahulu dikhawatirkan senyawa polar dan non polar akan tertarik kedalam pelarut polar, sehingga pemisahan tidak berjalan dengan selektif. Pelarut polar diketahui memiliki tetapan dielektrik yang tinggi sehingga dapat mengurangi daya tarik-menarik antara ion-ion dengan muatan elektron yang berlawanan, mempunyai kekuatan untuk menginvasi molekul serta ion dengan gaya interaksi dipol terutama pada pembentukan ikatan hidrogen, memiliki kekuatan untuk memecahkan ikatan kovalen pada elektrolit kuat dengan membentuk rekasi asam basa atau dikenal dengan reaksi amfiprotik, sehingga menyebabkan suatu senyawa dapat larut. Jika dibandingkan dengan pelarut polar, pelarut nonpolar memiliki konstanta dielektrik yang lemah sehingga tidak dapat mengurangi gaya tarik-menarik antara ion-ion dengan muatan elektron yang berlawanan sehingga tidak dapat memecahkan ikatan kovalen, elektrolit yang berionisasi lemah karena bersifat aprotik, dan tidak dapat membentuk jembatan hidrogen dengan pelarut nonelektrolit sehingga zat terlarut yang bersifat ionik dan bersifat polar tidak dapat larut dan hanya sedikit

larut dalam pelarut nonpolar (Gunawan dan Mulyani, 2004). Penggunaan metode fraksinasi bertingkat ini memungkinkan senyawa yang terkandung dalam ekstrak dapat terpisah sesuai tingkat kepolarannya kedalam pelarut yang digunakan.

Pada penelitian ini digunakan sampel ekstrak etanol daun putri malu sebagai sampel yang digunakan pada proses fraksinasi. Hasil penelitian pendahuluan menunjukkan bahwa pelarut etanol merupakan pelarut universal yang dapat mengekstraksi senyawa baik polar maupun non polar. Etanol dapat mengekstraksi beberapa senyawa polar seperti asam amino, gula, senyawa glikosida, terpenoid, saponin, tannin, lakton, flavon, polifenol, fenol, senyawa fenolik dengan berat molekul rendah hingga menengah dan polaritas medium aglycon flavonoid (Dehkarghanian et al., 2010). Selain itu pelarut etanol juga mampu menarik pigmen klorofil pada tanaman lebih baik daripada pelarut lainnya (Lan, 2011). Berdasarkan hasil KLT diketahui bahwa pada sampel ekstrak etanol terdapat beberapa senyawa seperti senyawa polifenol (flavonoid), dan pigmen klorofil. Hasil tersebut sesuai dengan studi pendahuluan yang telah dilakukan dimana senyawa polifenol dan pigmen klorofil dapat terekstraksi menggunakan pelarut etanol.

Proses fraksinasi diawali dengan menggunakan pelarut n-heksan yang merupakan pelarut non polar. Menurut Houghton dan Raman (1998) n-heksan cenderung menarik senyawa non polar seperti lignin, lilin, sterol, lipid, aglycon, dan terpenoid. Pelarut n-heksan juga mampu menarik senyawa non polar lain seperti furanokoumarin (Dey, 1989). Pelarut non polar juga mampu menarik beberapa jenis klorofil seperti klorofil A (lebih non polar daripada klorofil B) (Broyde, 1967).

Berdasarkan hasil KLT diketahui jika pada sampel fraksi n-heksan terdapat senyawa furanokoumarin, pigmen klorofil, alkaloid, dan saponin. Hasil KLT

tersebut menunjukkan jika hasil penelitian senyawa furanokoumarin dan pigmen klorofil yang terestraksi pada pelarut n-heksan sesuai dengan penelitian pendahuluan. Namun pada umumnya senyawa alkaloid dan saponin akan terestraksi pada pelarut semi polar maupun pelarut polar. Kedua senyawa ini muncul pada hasil fraksinasi pelarut n-heksan diduga karena proses pemisahan antara dua pelarut tidak terpisah dengan baik, sehingga dimungkinkan senyawa tersebut masuk pada fraksi n-heksan mengingat pelarut n-heksan merupakan pelarut pertama yang digunakan untuk proses fraksinasi sampel ekstrak etanol daun putri malu.

Pelarut selanjutnya yang digunakan pada proses fraksinasi adalah pelarut etil asetat yang merupakan senyawa semi polar. Menurut Houghton dan Raman (1998) etil asetat merupakan pelarut yang efektif digunakan untuk mengekstrak beberapa senyawa seperti senyawa alkaloid, aglycon, glikosida, terpenoid, sterol, dan flavonoid. Berdasarkan hasil KLT diketahui jika pada sampel fraksi etil asetat terdapat beberapa senyawa seperti alkaloid, saponin, dan flavonoid. Hasil tersebut sesuai dengan studi pendahuluan yang menyatakan bahwa senyawa flavonoid dan alkaloid akan efektif terestraksi pada pelarut etil asetat. Alkaloid merupakan senyawa semi polar yang tentunya akan tertarik kepelarut etil asetat yang merupakan pelarut semi polar. Senyawa flavonoid merupakan senyawa dengan rentang polaritas yang beragam. Menurut (Mabry,1970) pelarut semi polar dan polar dapat mengekstrasi senyawa glikosida flavonoid, sedangkan pelarut non polar akan efektif untuk mengekstraksi senyawa aglikon flavonoid. Selain itu pelarut etil asetat juga diketahui mampu mengekstraksi senyawa saponin. Menurut (Rijai, 2016) alkaloid-steroid saponin dapat diekstraksi dalam etil asetat,

sedangkan golongan steroidal saponin cenderung tertarik ke pelarut yang lebih polar misalnya n-butanol.

Fraksinasi selanjutnya menggunakan pelarut n-butanol yang merupakan pelarut semi polar. Konstanta dielektrik n-butanol lebih tinggi daripada etil asetat yaitu konstanta dielektrik 18 untuk n-butanol dan 6 untuk etil asetat. Selain itu, perbedaan mendasar dari kedua pelarut tersebut terletak pada ikatan hidrogen.

Pelarut etil asetat memiliki gaya ikatan hidrogen yang kurang baik dibandingkan pelarut n-butanol (Burke, 1984). Menurut (Mabry,1970) pelarut n-butanol efektif dalam menarik senyawa semi polar dan polar. Berdasarkan hasil KLT diketahui jika pada sampel fraksi n-butanol terdapat beberapa senyawa seperti alkaloid, saponin, dan flavonoid. Profil senyawa yang didapatkan pada fraksi n-butanol secara umum sama dengan pelarut etil asetat karena keduanya merupakan pelarut non polar. Hasil KLT ini sesuai dengan uraian dan literatur sebelumnya, namun senyawa saponin yang diduga terekstraksi kedalam pelarut n-butanol berdasarkan literatur merupakan golongan steroidal saponin (Rijai 2016).

Fraksi terakhir yang didapatkan adalah fraksi air. Pelarut air merupakan pelarut polar yang mampu menarik senyawa polar maupun senyawa non polar (Tambellini, 2013). Berdasarkan hasil KLT diketahui jika pada sampel fraksi air terdapat beberapa senyawa seperti alkaloid, dan saponin. Senyawa alkaloid merupakan senyawa semi polar, sedangkan saponin merupakan senyawa yang sebagian besar cenderung polar. Pelarut air merupakan pelarut yang dapat mengekstraksi senyawa baik polar maupun non polar, sehingga senyawa alkaloid dan saponin dapat tertarik pelarut air. Senyawa yang tertarik pada pelarut air lebih sedikit dari pelarut yang lain dikarenakan sebagian senyawa sudah terlebih

dulu terekstraksi kedalam pelarut yang terlebih dahulu digunakan sesuai indeks polaritasnya.

Massa fraksi yang didapatkan pada penelitian ini masing-masing sebesar 2,2992 gram (fraksi n-heksan), 2,2830 gram (fraksi etil asetat), 3,688 gram (fraksi n-butanol), dan 5,1227 gram (fraksi air). Massa tiap jenis fraksi yang didapatkan berbeda-beda karena dipengaruhi oleh faktor pelarut, dan mengakibatkan metabolit yang terkandung didalam tiap jenis fraksi berbeda-beda, sehingga berpengaruh pada massa sampel. Karakteristik dari fraksi yang didapatkan berbeda-beda, perbedaan karakteristik dari warna, bentuk, dan viskositas antar fraksi diduga akibat perbedaan pelarut yang digunakan sehingga mempengaruhi kandungan senyawa dan karakteristik dari fraksi yang dihasilkan.

6.3 Optimasi Fase Gerak KLT

Optimasi fase gerak yang akan digunakan pada prosedur KLT-Bioautografi ini dilakukan agar saat dilakukan proses KLT – Bioautografi, spot-spot metabolit dari tiap sampel dapat terpisah dengan baik sehingga dapat mempermudah proses identifikasi senyawa yang dimiliki dan mempermudah dalam mengamati aktivitas antibakteri dari tiap senyawa yang terpisah saat diuji dalam prosedur bioautografi. Optimasi dilakukan dengan fase diam silika dan beberapa jenis fase gerak dengan perbandingan tertentu seperti fase gerak kloroform : metanol (8:2), etil asetat : n-heksan (9:1), etil asetat : n-heksan (6 : 4), etil asetat : n-heksan (4 : 6), kloroform: aseton: asam formiat (2: 7: 1), kloroform: aseton: asam formiat (2: 7,5: 0,5) , dan kloroform: aseton: asam formiat dengan perbandingan (2,5: 7: 0,5).

Hasil eluasi kemudian diamati pada sinar UV 254 nm dan 366 nm (sebelum

penyemprotan dengan H_2SO_4) dan pada cahaya tampak dan sinar UV 366 nm (sesudah penyemprotan dengan H_2SO_4).

Dalam optimasi fase gerak ini digunakan reagen asam sulfat karena dianggap sebagai pereaksi kromogenik universal dan biasanya digunakan pada tahap *postchromatographic* sebagai reagen umum untuk identifikasi kualitatif senyawa. H_2SO_4 bersifat reduktor yang dapat memutuskan ikatan rangkap sehingga panjang gelombangnya bertambah dan warna noda dapat dilihat pada cahaya tampak. Adapun proses pemanasan pada pemanas listrik dimaksudkan untuk membantu proses pemutusan ikatan tersebut. Mekanismenya disebabkan karena H_2SO_4 memiliki gugus OH sehingga berfungsi sebagai ausokrom, dimana ausokrom ini dapat menyebabkan pergeseran batokromik yaitu pergeseran ke arah panjang gelombang yang lebih panjang. Konsentrasi H_2SO_4 yang digunakan adalah 10% karena jika konsentrasinya terlalu pekat maka dapat merusak lempeng namun jika konsentrasinya terlalu rendah maka kemampuan pemutusan ikatannya tidak maksimal (Iskandar, 2007).

Berdasarkan Andersen (2006) diketahui bahwa senyawa golongan flavonoid menunjukkan noda gelap pada pengamatan dibawah sinar UV 254 nm, menunjukkan warna noda coklat kekuningan ketika diamati dibawah sinar tampak dan menunjukkan warna noda kehijauan, kuning gelap atau kebiruan ketika diamati dibawah sinar UV 366 nm. Menurut Debendeti (2009), senyawa alkaloid menunjukkan spot kegelapan ketika diamati dibawah sinar UV 254 nm, sedangkan ketika diamati dibawah sinar UV 366 nm akan terlihat berwarna keunguan, biru, atau biru kehijauan. Senyawa tannin menunjukkan warna oranye ketika diamati dibawah sinar UV 366 nm. Pigmen klorofil menurut studi pendahuluan diketahui akan terlihat berwarna gelap ketika diamati dibawah sinar UV 254 nm, sedangkan

pada pengamatan dibawah sinar UV 366 nm akan memancarkan fluoresensi kemerahan (Sherma, 2003). Senyawa furanokoumarin dilaporkan menunjukkan warna gelap dibawah sinar UV 254 nm dan kekuningan ketika diamati dibawah sinar UV 366 nm (Dinan, 2005). Senyawa saponin menunjukkan spot berwarna keunguan pada sinar UV 366 nm setelah disemprot menggunakan H_2SO_4 dan dilakukan pemanasan (Glenks, 2005).

Hasil optimasi menunjukkan terdapat spot yang terpisah dengan baik pada fase gerak yang optimal untuk masing-masing sampel. Adapun fase gerak yang optimal adalah fase gerak kloroform:aseton:asam formiat (2 : 7,5 : 0,5) untuk ekstrak dan fraksi air, fase gerak kloroform : metanol (8 : 2) untuk fraksi n-heksan, fase gerak etil asetat : n-heksan (4 : 6) untuk fraksi etil asetat, dan fase gerak kloroform : aseton : asam formiat (2 : 7 : 1) untuk fraksi n-butanol.

Pada fase gerak kloroform : metanol (8:2) diketahui jika terdapat sembilan spot noda dengan Rf dan warna berbeda pada sampel uji dilihat pada sinar UV 254 nm dan sinar UV 366 nm untuk kondisi sebelum disemprot H_2SO_4 , dan pada cahaya tampak dan UV 366 nm untuk kondisi setelah disemprot H_2SO_4 . Spot tersebut tersebar pada sampel ekstrak, n-heksan, dan etil asetat. Sedangkan pada fraksi n-butanol dan fraksi air diketahui jika tidak ditemukan adanya spot noda. Hasil tersebut diduga karena fase gerak yang digunakan kurang optimal untuk mengeluasi sampel fraksi n-butanol dan fraksi air, sehingga senyawa dalam fraksi tersebut tidak dapat terpisah dengan optimal. Seperti diketahui fase gerak ini bersifat non polar, sedangkan fraksi n-butanol dan air cenderung polar. Sehingga fase gerak tersebut tidak dapat mengeluasi fraksi tersebut dengan baik.

Pada fase gerak ini diduga terdapat senyawa metabolit seperti alkaloid dan saponin (Rf₁, Rf₅, Rf₈), pigmen klorofil (Rf₆, Rf₇, Rf₈, Rf₉), dan furonokoumarin

(Rf₃, Rf₄). Pada hasil optimasi fase gerak kloroform : metanol (8:2) diketahui jika terdapat Rf yang bernilai sama namun menunjukkan warna spot yang berbeda pada sampel yang berbeda. Kondisi ini diduga akibat pengaruh proses fraksinasi yang mengakibatkan kandungan senyawa pada tiap sampel memiliki profil berbeda akibat pengaruh perbedaan polaritas. Berdasarkan hasil pengamatan diketahui jika terdapat satu spot noda yang tidak dapat ditentukan senyawanya pada Rf₂, karena spot hanya terlihat pada cahaya tampak berwarna kecoklatan, pada UV 254 nm berwarna hijau kehitaman, sedangkan pada sinar UV 366 nm tidak terlihat, sehingga data dirasa kurang cukup untuk menyimpulkan senyawa apa yang terdapat pada Rf₂ mengingat tidak ada analisis senyawa pembanding yang dilakukan.

Berdasarkan hasil penelitian pada fase gerak etil asetat : n-heksan (4 : 6) diketahui jika terdapat enam spot dengan Rf dan warna berbeda yang tersebar pada semua sampel uji, sehingga dirasa sudah cukup optimal. Berdasarkan hasil penelitian yang dianalisa berdasarkan studi literatur sebelumnya, pada fase gerak ini diduga terdapat senyawa metabolit seperti flavonoid (Rf₂, Rf₃, Rf₄, Rf₅), alkaloid atau saponin (Rf₃, Rf₅, Rf₆), dan furonokoumarin (Rf₅). Pada fase gerak ini pada spot dengan Rf sama yaitu (Rf₅) menunjukkan warna yang berbeda-beda pada tiap sampel. Kondisi tersebut diakibatkan karena senyawa yang terfraksinasi pada tiap pelarut mungkin memiliki profil yang berbeda akibat perbedaan polaritas pelarut yang digunakan, sehingga berpengaruh pada warna spot pada tiap sampel.

Berdasarkan hasil optimasi pada fase gerak kloroform: aseton: asam formiat (2: 7: 1), diketahui jika terdapat sepuluh spot dengan Rf dan warna yang berbeda ketika diamati bawah sinar UV 254 nm, UV 366 nm, sinar tampak dan pada UV 366 nm setelah disemprot H₂SO₄. Kesepuluh spot tersebut tersebar pada semua

sampel meliputi sampel ekstrak etanol, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, fraksi n-butanol, dan fraksi air. Perbandingan pelarut ini dirasa sudah cukup optimal karena

mampu mengeluasi seluruh sampel uji dan spot sudah terpisah dengan baik.

Berdasarkan hasil penelitian yang dianalisa berdasarkan studi literatur

sebelumnya, pada fase gerak ini diduga terdapat senyawa metabolit seperti

flavonoid ($Rf_1, Rf_3, Rf_5, Rf_6, Rf_7, Rf_8, Rf_9$) dan klorofil, alkaloid atau saponin (Rf_{10}).

Pada fase gerak ini, spot dengan Rf sama yaitu (Rf_7) menunjukkan warna yang

berbeda-beda pada sampel ekstrak, fraksi n-heksan, dan fraksi etil asetat. Pada

sampel ekstrak dan fraksi n-heksan diketahui spot pada Rf_7 menunjukkan warna

kehijauan dilihat pada UV 366 nm (setelah penyemprotan dengan H_2SO_4), namun

pada fraksi etil asetat diketahui bahwa warna spot pada UV 254 nm berwarna hijau

kehitaman, pada UV 366 nm sebelum disemprot berwarna kehijauan, pada cahaya

tampak berwarna kecoklatan sedangkan pada UV 366 nm (setelah penyemprotan

dengan H_2SO_4) berwarna kebiruan. Berdasarkan karakteristik tersebut keduanya

diduga merupakan golongan flavonoid. Terdapat beberapa nilai Rf yang tidak

dapat dikategorikan masuk kedalam senyawa golongan apa dikarenakan data

hasil pengamatan dirasa kurang, Rf tersebut meliputi Rf_2 dan Rf_4 karena kedua

spot pada Rf tersebut tidak menunjukkan warna pada pengamatan dibawah sinar

UV 366 nm (sebelum dan setelah penyemprotan dengan H_2SO_4).

Hasil optimasi fase gerak kloroform: aseton: asam formiat (2: 7,5: 0,5)

menunjukkan jika terdapat sepuluh spot dengan Rf dan warna yang berbeda ketika

diamati bawah sinar UV 254 nm, UV 366 nm, sinar tampak, dan pada UV 366 nm

setelah disemprot H_2SO_4 . Kesepuluh spot tersebut tersebar pada semua sampel

meliputi sampel ekstrak etanol, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, fraksi n-butanol,

dan fraksi air. Berdasarkan hasil penelitian yang dianalisa berdasarkan studi

literatur, pada fase gerak ini diduga terdapat beberapa senyawa metabolit seperti flavonoid (Rf₁, Rf₂, Rf₄, Rf₅, Rf₆, Rf₇, Rf₈, Rf₉), klorofil (Rf₁₀), tanin (Rf₈, Rf₉) alkaloid atau saponin (Rf₅, Rf₁₀). Pada hasil eluasi ini dapat diketahui jika terdapat beberapa Rf (Rf₅, Rf₈, Rf₁₀) dengan nilai sama yang memiliki warna spot yang berbeda.

Kondisi tersebut diakibatkan karena senyawa yang terfraksinasi pada tiap pelarut mungkin memiliki profil yang berbeda akibat perbedaan polaritas pelarut yang digunakan, sehingga berpengaruh pada warna spot pada tiap sampel. Selain itu terdapat beberapa spot yang tidak dapat diketahui termasuk golongan apa dikarenakan spot yang muncul hanya berada disalah satu sinar yang digunakan sehingga data yang didapat dirasa masih kurang karena tidak ada metode analisa perbandingan yang digunakan.

Berdasarkan hasil optimasi fase gerak diketahui bahwa terdapat beberapa spot yang tidak jelas atau disebut *tailing*. Menurut Hendaya (2006) terdapat beberapa faktor yang menyebabkan terjadinya *tailing* adalah terlalu banyak sampel yang ditotolkan (*overloading*), sehingga fase gerak tidak mampu membawa solut dengan sempurna dan menyebabkan terjadinya *tailing*. Selain itu dapat pula diakibatkan karena fase gerak yang digunakan terlalu polar sehingga berakibat sampel bergerak terlalu cepat pada fase diam.

6.4 Optimasi Konsentrasi dengan Metode Difusi Cakram

Optimasi konsentrasi dilakukan menggunakan dua serial konsentrasi menggunakan metode difusi cakram. Serial konsentrasi pertama meliputi konsentrasi 40 µg/ml, 80 µg/ml, 160 µg/ml, dan 320 µg/ml yang didasarkan pada beberapa studi pendahuluan yang telah dilakukan, dan serial kedua meliputi konsentrasi 25 mg/ml, 50 mg/ml, 100 mg/ml, dan 200 mg/ml didasarkan pada hasil

trial konsentrasi. Berdasarkan hasil uji, pada serial konsentrasi pertama menggunakan sampel ekstrak tidak menunjukkan adanya zona hambat. Hal tersebut berbeda dengan hasil studi pendahuluan yang telah dilakukan Radjendran (2010) dimana hasil pengujiannya menunjukkan adanya zona hambat dimulai dari konsentrasi 33,33 µg/ml. Adanya perbedaan hasil tersebut diduga karena adanya perbedaan asal dari tanaman *Mimosa pudica* yang digunakan, perbedaan pelarut yang digunakan untuk proses ekstraksi, serta perbedaan dari bakteri yang digunakan untuk pengujian. Selain itu, perbedaan bakteri yang digunakan dalam pengujian juga diduga merupakan salah satu faktor yang berpengaruh terhadap konsentrasi yang digunakan. Hal tersebut dipengaruhi akibat perbedaan struktur morfologi dari bakteri serta respons bakteri terhadap sampel uji yang bersifat spesifik. Pada penelitian pendahuluan yang dilakukan Radjendran (2011) diketahui menggunakan bakteri standar *Staphylococcus aureus*, sedangkan pada penelitian ini menggunakan bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* dari pasien. Perbedaan jenis bakteri dan asal dari bakteri tentunya akan mempengaruhi struktur morfologi, genetika, dan respons dari bakteri. Bakteri yang berasal dari pasien pada umumnya memiliki respons terhadap antibiotik yang cenderung lebih rendah daripada pada bakteri standar, sehingga konsentrasi yang digunakan pada bakteri yang berasal dari pasien umumnya lebih besar saat dilakukan pengujian. Hal tersebut dapat dipengaruhi oleh banyaknya resistensi pada bakteri yang berasal dari pasien akibat konsumsi antibiotik yang tidak tepat sehingga dapat mengubah genetika dari bakteri (Gnanamani et al., 2017).

Serial konsentrasi kedua didasarkan pada proses trial konsentrasi dengan mencoba langsung secara eksperimental beberapa jenis konsentrasi meliputi

konsentrasi 25 mg/ml, 50 mg/ml, 100 mg/ml, dan 200 mg/ml. Berdasarkan hasil uji diketahui bahwa zona hambat yang terbentuk pada bakteri terhadap sampel ekstrak mulai muncul pada konsentrasi 100 mg/ml, sehingga untuk uji aktivitas antibakteri dari bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* terhadap sampel ekstrak dan fraksi dipilih 5 jenis konsentrasi yang didasarkan pada hasil optimasi dan studi pendahuluan, yaitu 100 mg/ml, 200 mg/ml, 300 mg/ml, 400 mg/ml, dan 500 mg/ml atau setara dengan dosis 3 mg, 6 mg, 9 mg, 12 mg, dan 15 mg.

6.5 Uji Aktivitas Antibakteri pada *MRSA* dengan Metode Difusi Cakram

Uji aktivitas antibakteri dari bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* terhadap sampel ekstrak dan fraksi dilakukan menggunakan metode difusi cakram. Berdasarkan hasil penelitian, diketahui jika terdapat penurunan pertumbuhan bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* seiring dengan peningkatan konsentrasi uji. Aktivitas antibakteri terbesar hingga terkecil secara berturut-turut yang didasarkan pada diameter zona hambat yang terbentuk terdapat pada fraksi etil asetat, ekstrak, fraksi air, fraksi n-butanol, dan yang terakhir adalah fraksin-heksan. Hasil penelitian yang didapat menunjukkan bahwa fraksi etil asetat memiliki aktivitas antibakteri lebih baik daripada ekstrak dan fraksi lainnya. Hal tersebut diduga terjadi karena etil asetat merupakan pelarut semipolar yang dapat menarik senyawa baik polar maupun non polar, sehingga banyak senyawa metabolit yang tertarik pada fraksi etil asetat (Gunawan dan Mulyani, 2004). Sebaliknya pada fraksi n-heksan diketahui bahwa aktivitas hambatan terhadap pertumbuhan bakteri *MRSA* dinilai lebih rendah daripada yang lain, hal tersebut dapat diakibatkan karena senyawa yang bersifat antibakteri pada fraksi

n-heksan diduga lebih sedikit daripada ekstrak dan fraksi yang lain. Hasil tersebut sesuai dengan penelitian yang dilakukan Rajendran (2010) yang menunjukkan bahwa senyawa yang terdapat pada fraksi n-heksan jauh lebih sedikit dari fraksi etil asetat dan ekstrak metanol. Pada penelitian tersebut senyawa yang terdapat pada fraksi n-heksan meliputi karbohidrat, steroid, dan saponin. Senyawa yang terdapat pada fraksi etil asetat meliputi alkaloid, glikosida, karbohidrat, dan flavonoid. Sedangkan senyawa pada ekstrak metanol meliputi alkaloid, glikosida, karbohidrat, steroid, fenol, dan flavonoid.

Pada fraksi etil asetat, diameter zona hambat yang terbentuk pada uji pertama menggunakan dosis 15 mg sebanding dengan diameter zona hambat antibiotik vankomisin disk standar 3.0 (setara dengan konsentrasi vankomisin 30 µg). Sedangkan pada uji kedua dan ketiga, diameter zona hambat yang terbentuk menggunakan dosis 15 mg lebih baik daripada standar vankomisin 3.0. Berdasarkan hasil uji tersebut dapat diketahui jika aktivitas antibakteri vankomisin masih lebih baik dalam menghambat aktivitas bakteri *MRSA* daripada fraksi etil asetat, dikarenakan konsentrasi yang dibutuhkan jauh lebih kecil untuk menghambat aktivitas dari bakteri *MRSA* pada diameter zona hambat yang sebanding. Namun fraksi etil asetat sangat berpotensi untuk dilakukan penelitian lebih lanjut dikarenakan berpotensi sebagai antibakteri dimasa mendatang, mengingat saat ini resistensi terhadap vankomisin sudah mulai banyak terjadi (strain *Vankomycin Resistant Staphylococcus aureus*) (Gnanamani *et al.*, 2017).

Berdasarkan hasil penelitian dapat diketahui jika konsentrasi dengan aktivitas antibakteri terbesar pada keseluruhan sampel uji teletak pada dosis 15 mg, sedangkan konsentrasi terendah yang menunjukkan mulai munculnya zona hambat menunjukkan nilai yang berbeda antar sampel uji. Pada fraksi n-heksan,

etil asetat, dan n-butanol, zona hambat mulai muncul pada dosis 3 mg, sedangkan pada fraksi air, zona hambat mulai muncul pada dosis 6 mg. Perbedaan konsentrasi terendah yang mulai menunjukkan aktivitas hambatan antar sampel berbeda-beda diduga karena perbedaan kuantitas senyawa metabolit yang terdapat pada tiap sampel akibat kepolaran yang berbeda, hal tersebut sesuai dengan hasil optimasi fase gerak KLT yang menunjukkan jika senyawa metabolit yang diduga memiliki aktivitas antibakteri, diketahui lebih banyak terdapat difraksi etil asetat. Pada penelitian ini juga didapatkan diameter zona hambat yang berbeda-beda dari tiap replikasi. Perbedaan diameter zona hambat yang terbentuk pada tiap pengulangan uji tersebut diduga karena kode bakteri yang digunakan berbeda, sehingga kepekaan dari tiap bakteri terhadap sampel uji juga berbeda-beda (Gnanamani *et al.*, 2017).

Berdasarkan data hasil pengujian diketahui jika pada keseluruhan hasil uji dengan tiga replikasi, sampel kontrol negatif DMSO tidak menunjukkan aktivitas antibakteri. Hasil tersebut sesuai karena pada penelitian, kontrol negatif memang seharusnya tidak memiliki aktivitas apapun terhadap objek penelitian. Aktivitas hambatan kontrol positif vankomisin menunjukkan nilai zona hambat yang cukup tinggi yaitu 18 mm pada bakteri kode pertama, dan 19 mm pada bakteri kode kedua dan ketiga. Berdasarkan hasil uji VITEX diketahui bahwa ketiga sampel bakteri tersebut sensitif terhadap vankomisin yang sesuai dengan hasil uji dimana menurut CLSI (2012), antibiotic vankomisin termasuk sensitif apabila zona hambatnya ≥ 17 mm.

Berdasarkan hasil pengujian statistika dengan uji Friedman, didapatkan nilai $p=0,000$ ($p<0,05$), sehingga dapat diketahui jika terdapat hubungan antara perbedaan dosis uji dan jenis sampel terhadap aktivitas antibakteri yang diketahui

dari lebar zona hambat yang dihasilkan. Untuk mengetahui signifikansi hubungan antara dosis uji dan jenis sampel terhadap zona hambat yang dihasilkan selanjutnya dilakukan uji *post hoc* menggunakan uji Wilcoxon. Berdasarkan hasil uji didapatkan nilai probabilitas secara keseluruhan adalah $>0,05$, sehingga dapat disimpulkan bahwa secara keseluruhan hubungan antara konsentrasi dan jenis sampel terhadap aktivitas antibakteri yang dihasilkan tidak berbeda secara signifikan. Analisis data selanjutnya yang dilakukan menggunakan grafik dapat diketahui bahwa ekstrak dan fraksi ekstrak etanol daun putri malu memiliki efek antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* dengan metode difusi cakram secara *in vitro*. Berdasarkan grafik tersebut dapat diketahui jika peningkatan konsentrasi berpengaruh terhadap zona hambat yang dihasilkan. Adanya nilai rerata uji pada konsentrasi tertentu yang menurun tajam daripada konsentrasi sebelumnya dikarenakan pada uji replikasi kedua dan ketiga terdapat beberapa sampel uji pada konsentrasi tertentu yang tidak menunjukkan aktivitas antibakteri berupa zona hambat. Kondisi tersebut dapat terjadi karena proses replikasi menggunakan sampel uji dari kode bakteri yang berbeda, sehingga berpengaruh terhadap respon yang dihasilkan pada pengujian dimana dari ketiga bakteri tersebut tentunya memiliki genetika / mutasi yang mungkin berbeda sehingga berpengaruh pada kepekaan bakteri (Gnanamani *et al.*, 2017). Selain itu, berdasarkan hasil pengujian juga diketahui bahwa tidak semua spot yang terlihat pada hasil KLT menunjukkan zona hambat pada proses KLT bioautografi. Kondisi tersebut dapat disebabkan karena konsentrasi senyawa tiap metabolit yang terdapat pada masing-masing fraksi mungkin terlalu kecil, sehingga tidak mencukupi untuk menekan aktivitas pertumbuhan dari bakteri *MRSA*.

6.6 Uji KLT-Bioautografi

Berdasarkan hasil uji bioautografi, senyawa yang diduga terkandung pada ekstrak dan fraksi etanol daun putri malu dan bersifat sebagai antibakteri yaitu golongan flavonoid, alkaloid, klorofil, dan saponin.

Berdasarkan hasil penelitian, senyawa yang diduga memiliki aktivitas sebagai antibakteri adalah pigmen klorofil. Menurut (Sherma, 2003) klorofil akan terlihat berwarna gelap ketika diamati dibawah sinar UV 254 nm dan memancarkan fluoresensi kemerahan ketika diamati dibawah sinar UV 366 nm.

Karakteristik senyawa tersebut sesuai dengan hasil KLT-Bioautografi pada sampel fraksi n-heksan yang menunjukkan zona hambatan pada Rf 0,814. Menurut Maekawa (2007), klorofil memiliki aktivitas dalam menghambat pertumbuhan bakteri dan jamur dengan mekanisme gangguan pada permeabilitas dan toleransi dari sel.

Senyawa kedua yang diduga memiliki aktivitas antibakteri adalah alkaloid dan saponin. Menurut Debendeti (2009), alkaloid memberikan warna yang khas ketika diamati dibawah sinar UV. Senyawa alkaloid ketika diamati dibawah sinar UV 254 nm akan terlihat berwarna kegelapan, sedangkan ketika diamati dibawah sinar UV 366 nm akan memancarkan fluoresensi berwarna keunguan, biru, atau biru kehijauan. Sedangkan senyawa saponin menurut Glensk (2012) memiliki spot noda berwarna keunguan setelah disemprot dengan H_2SO_4 dan dipanaskan kemudian diamati dibawah sinar UV 366 nm. Karakteristik senyawa tersebut sesuai dengan hasil KLT-Bioautografi pada sampel fraksi etil asetat yang menunjukkan zona hambatan pada Rf 0,329. Aktivitas alkaloid dalam menghambat aktivitas dari bakteri didasarkan pada adanya hambatan pada pompa efflux bakteri. Alkaloid juga dilaporkan dapat mengganggu komponen

penyusun peptidoglikan pada sel, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh (Cushnie, 2014). Untuk mekanisme saponin dalam menghambat aktivitas bakteri, diduga akibat aktivitasnya dalam membentuk ikatan antara protein dan sterol pada permukaan membran sel bakteri dan mengganggu permeabilitasnya (Godstime, 2014).

Senyawa terakhir yang diduga memiliki aktivitas sebagai antibakteri adalah flavonoid. Menurut Andersen (2006) senyawa golongan flavonoid akan memberikan warna khas ketika diamati pada prosedur kromatografi menggunakan silika GF₂₅₄ nm. Flavonoid pada sinar UV 254 nm (baik sebelum dan disemprot reagen) akan menunjukkan warna noda gelap. Flavonoid juga menunjukkan warna noda coklat hingga coklat kekuningan ketika diamati dibawah sinar tampak, sedangkan ketika diamati dibawah sinar UV 366, flavonoid akan menunjukkan warna noda kehijauan, kuning gelap atau kebiruan. Spot noda dengan karakteristik tersebut ditemukan terdapat pada sampel ekstrak pada Rf 0,857 dan fraksi n-butanol pada Rf 0,971. Berdasarkan hasil proses KLT-Bioautografi, pada spot tersebut terdapat zona bening atau zona yang tidak berubah warna dibandingkan area sekitar setelah disemprot MTT 0,5% dan didiamkan selama 1 hari pada suhu 24°C dan 1 jam pada suhu 37°C. Adanya zona hambat tersebut menunjukkan jika senyawa yang terdapat pada Rf 0,971 memiliki aktivitas sebagai antibakteri.

Menurut Cushnie dan Lamb (2005), mekanisme flavonoid sebagai antibakteri disebabkan oleh tiga mekanisme yaitu, penghambatan sintesis asam nukleat, penghambatan fungsi membran sitoplasma, dan penghambatan pada metabolisme energi. Pada penelitian Hatano *et al* (2005) menyebutkan bahwa flavonoid menunjukkan aktivitas antibakteri dengan mekanisme penghambatan terhadap pompa eflux *MRSA*. Beberapa tinjauan lain juga menyebutkan bahwa,

penghambatan sintesis membran sel dan efek agregat pada sel bakteri juga merupakan mekanisme aktivitas antibakteri dari flavonoid.

Berdasarkan hasil uji KLT-bioautografi, tidak dapat disimpulkan senyawa metabolit mana yang memiliki aktivitas antibakteri paling potensial dikarenakan zona bening yang terbentuk tidak terlalu jelas dan memiliki ukuran yang relatif sama. Namun menurut literatur, senyawa flavonoid memiliki aktivitas antibakteri yang lebih dominan daripada senyawa lain dikarenakan flavonoid memiliki beberapa mekanisme hambatan terhadap pertumbuhan bakteri. Mekanisme hambatan flavonoid pada bakteri seperti, hambatan pada sintesis asam nukleat. Proses hambatan ini dapat terjadi akibat adanya aktivitas dari cincin B dari flavonoid yang mengakibatkan adanya proses interkalasi atau ikatan hidrogen dengan susunan basa dari asam nukleat sehingga berakibat pada penghambatan sintesis DNA dan RNA. Mekanisme kedua yaitu aktivitas penghambatan fungsi dari membran sitoplasma. Penelitian pendahuluan melaporkan bahwa sophoraflavanone G (komponen dari flavonoid) memiliki aktivitas antibakteri dalam melawan bakteri *MRSA*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sophoraflavanone G mengurangi fluiditas lapisan membran luar dan dalam dari bakteri. Selanjutnya mekanisme ketiga adalah melalui hambatan pada metabolisme energi dengan menghambat NADH-sitokrom c reduktase (Cushine, 2005). Berdasarkan hasil pengamatan dapat diketahui bahwa hipotesis mengenai senyawa alkaloid, saponin, dan flavonoid / polifenol memiliki aktivitas antibakteri terbukti pada penelitian ini.

Berdasarkan hasil KLT Bioautografi dapat diketahui jika fase gerak yang digunakan tidak memiliki aktivitas dalam menghambat bakteri *MRSA*. Hal tersebut diketahui dari hasil KLT Bioautografi menggunakan KLT pembanding (KLT tanpa

sampel yang dievaluasi menggunakan fase gerak hasil optimasi) dimana hasil pengujian menunjukkan bahwa warna pada setelah proses KLT Bioautografi berwarna keunguan tanpa adanya zona hambat yang terlihat pada seluruh plat KLT pembanding. Menurut (Kusumaningtyas, 2008) warna keunguan pada plat KLT hasil dari proses KLT Bioautografi menunjukkan adanya aktivitas dari bakteri yang hidup. Warna keunguan ini diakibatkan karena proses pemecahan garam tetrazolium akan dipecah oleh dihidrogenase sehingga menghasilkan formazena ungu. Apabila ada senyawa yang menghambat aktivitas pertumbuhan bakteri maka garam tetrazolium tidak akan berubah warna sehingga akan terbentuk zona bening / berwarna tetap. Zona hambat yang terbentuk pada proses KLT Bioautografi ini tidak terlalu lebar, hal tersebut diduga karena pada proses KLT Bioautografi menggunakan metode langsung ini tidak terjadi proses difusi sehingga aktivitas senyawa dalam menghambat bakteri dirasa kurang maksimal, selain itu pada metode bioautografi langsung ini sulit untuk menentukan apakah proses kontak antara suspensi bakteri dan plat KLT sudah optimal. Apabila proses kontak ini belum optimal tentunya akan berpengaruh terhadap hasil dari pengujian.

6.7 Implikasi terhadap Bidang Kefarmasian

Implikasi dari penelitian yang berjudul “Aktivitas Antibakteri Fraksi Ekstrak Etanol Daun Putri Malu (*Mimosa pudica*) terhadap Bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* secara *In Vitro*” terhadap bidang kefarmasian adalah didapati bahwa pelarut yang efektif untuk mengekstrak daun putri malu yang berpotensi sebagai agen antibakteri baru untuk selanjutnya dikembangkan dalam bentuk formulasi dan sistem penghantaran obat tertentu sebagai sediaan antibakteri. Selain itu dengan diketahuinya fraksi etil asetat sebagai fraksi yang

memberikan efek paling potensial terhadap bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*, maka dapat dilakukan penelitian lanjutan terhadap kandungan senyawa bioaktif dari fraksi etil asetat untuk kemudian dilakukan isolasi dan analisa aktivitas antibakterinya lebih lanjut.



BAB 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa :

1. Ekstrak etanol daun putri malu dan fraksinya (fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, fraksi n-butanol, dan fraksi air) memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*.
2. Aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun putri malu dan fraksinya (fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, fraksi n-butanol, dan fraksi air) terhadap bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* meingkat seiring dengan peningkatan konsentrasi uji yang diketahui berdasarkan diameter zona hambat. Berdasarkan hasil uji statistika aktivitas antibakteri dari seluruh sampel uji mulai dosis 3 mg diketahui sebanding dengan antibiotik vankomisin 30 µg.
3. Fraksi etil asetat merupakan fraksi yang memiliki aktivitas hambatan terbesar berdasarkan uji antibakteri dengan metode difusi cakram, dimana zona hambat fraksi etil asetat pada konsentrasi 15 mg lebih baik daripada antibiotik vankomisin 30 µg.
4. Berdasarkan hasil uji KLT diketahui jika tiap fraksi memiliki profil metabolit yang berbeda. Ekstrak etanol daun putri malu (*Mimosa pudica*) mengandung metabolit golongan flavonoid dan pigmen klorofil. Fraksi n-heksan mengandung metabolit golongan alkaloid, saponin, furanokoumarin, dan klorofil. Fraksi etil asetat mengandung metabolit golongan flavonoid, alkaloid,

saponin, dan furanokoumarin. Fraksi n-butanol mengandung metabolit golongan flavonoid, alkaloid, dan saponin. Fraksi air mengandung metabolit golongan flavonoid, alkaloid, dan saponin.

5. Senyawa golongan flavonoid dari ekstrak etanol daun putri malu (*Mimosa pudica*) dan fraksi etil asetat ekstrak etanol daun putri malu, pigmen klorofil dari fraksi n-heksan ekstrak etanol daun putri malu, serta alkaloid dan saponin dari fraksi etil asetat ekstrak etanol daun putri malu menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* berdasarkan hasil uji dengan metode KLT-bioautografi.

7.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat diketahui jika aplikasi pengujian *in-vitro* tentunya masih memerlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui dosis yang aman dan tepat untuk fraksi dari ekstrak etanol daun putri malu (*Mimosa pudica*) agar dapat berfungsi sebagai antimikroba terhadap bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*. Untuk itu diperlukan uji lanjutan pada hewan coba untuk mengetahui efek farmakokinetik, farmakodinamik, serta toksisitasnya.

Selain itu perlu dilakukan kuantifikasi serta isolasi dari senyawa metabolit yang bersifat sebagai antibakteri untuk memudahkan proses standarisasi dan penentuan dosis.

DAFTAR PUSTAKA

Abirami S.K., Gangai K., Sudhamani M., Nishadevi P., and Nirmaladevi. The Antimicrobial Activity of *Mimosa Pudica*. *International Journal of Ayurveda and Pharma Research*, 2014, 2 (1) : 105-108.

Akhyar. *Uji Daya Hambat dan Analisis KLT Bioautografi Ekstrak Akar dan Buah Bakau (Rhizophora stylosa Griff.) terhadap Vibrio harveyi*. Skripsi. Tidak diterbitkan, Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin, Makassar. 2010.

Andersen O.M., and Kenneth R.M. *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry, and Applications*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 2006. p. 397-398.

Arora M., and Singh A. A Review on *Mimosa Pudica* : A Useful Weed, (Online), (<http://www.pharmatutor.org/articles/review-on-mimosa-pudica-useful-weed>, diakses 01 Mei 2017).

Azwanida N.N. A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Med Aroma Plants*, 2015, 4 (3) : 1-6.

Bhambri S., and Kim G. Use of Oral Doxycycline for Community-Acquired Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) Infections. *The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology*, 2009, 2 (4) : 45-50.

Bourne M.C. *Food Texture and Viscosity Concept and Measurement*. John Wiley And Jons, New York, 1982. p. 73-144.

BPOM. *Pusat Informasi Obat Nasional : Vankomisin*, (Online), (<http://www.pionas.pom.go.id/monografi/vankomisin>, diakses 25 November 2017).

Broekema N.M., Van T.T., Monson T.A., Marshall S.A., Warshauer D.M. Comparison of Cefoxitin and Oxacillin Disk Diffusion Methods for Detection of mecA-Mediated Resistance in *Staphylococcus aureus* in Large-Scale Study. *J Clin Microbiol*. 2009, 1(1) : 217-219.

Broyde S. B., and Brody S. S. Emission Spectra of Chlorophyll-a in Polar and Non Polar Solvents. *The Journal of Chemical Physics*, 1967, 46(9) : 3334-3340.

Burke, J. Solubility Parameters: Theory and Application. *The American Institute for Conservation*, 1984, 3 (1) 1:5.

Chandra G., and Mukherje S. Efficacy of Extracts of Six Medicinal Plants of India Against Some Pathogenic Bacteria. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 2012, 04 (1) : 23-27.

Chen C.J. New Epidemiology of *Staphylococcus aureus* Infection in Asia. *Clinical Microbiology and Infection*, 2014, 20 (7) : 605 – 623.

Choma I., and Grzelak E. Bioautography detection in Thin-Layer Chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2011, 1218 (19) : 2684 - 91.

Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). *Performance Standards for Antimicrobial Disc Susceptibility Test Edisi Sebelas*. Penerbit CLSI, USA, 2012.

Cowan M.M., Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1999, 1(12): 564–582.

Cushnie T. P. T., and Lamb A. J. Antimicrobial Activity of Flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2005, 26(5) : 343-356.

Cushnie T. P. T., Cushine B., and Lamb A. J. Alkaloids : An Overview of Their Antibacterial, Antibiotic-Enhancing and Antivirulence Activities. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2014, 5(44) : 377-386.

Dalimartha, S. *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia Jilid 2*. Trubus Agriwidya, Jakarta, 2006. hal.20-40.

David, K.H., MRSA Update. *Pediatrics / Infectious Disease & Immunology / Alergy*. Santa Clara Valley Medical Center, Stanford University Medical School, 2010. p.20-70.

Debenedetti S. Isolation, Identification and Characterization of Allelochemicals. Penerbit TLC dan PC Publisher, Buenos Aires, 2009. p. 30-66.

Dehkharghanian M., Adenier H., Vijayalakshmi M.A. Analytical Methods Study of Flavonoids in Aqueous Spinach Extract using Positive Electropray Ionisation Tandem Quadrupole Mass Spectrometry. *Food Chemistry*, 2010,12(1) : 863–870.

Departemen Kesehatan Republik Indonesia. *Farmakope Indonesia*, Edisi IV, Departemen Kesehatan RI, Jakarta, 1995. hal. 780-782.

Dey P.M., and Harborne J.B. Methods in Plant Biochemistry, Volume 1. Academic Press, San Diego, 1989. p. 57-122.

Dinan L. Dereplication and Partial Identification of Compounds, in Sarker S.D., Latif Z., and Gray A.I., *Natural Products Isolation*, 2nd edition, Humana Press Inc, Totowa, New Jersey, 2005. p. 30-58.

Dzen SM, Roekorningsih, Santoso S, Winarsih S. Bakteriologi Medik, Bayumedia Publishing, Malang, 2003. hal. 191-206.

Fajriaty I., Hariyanto IH., Saputra IR., Silitonga M. Skrining Fitokimia Dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Dari Ekstrak Etanol Buah Lerak (*Sapindus rarak*). *Jurnal Pendidikan Informatika dan Sains*, 2017, 6 (2) : 243.

Gandhiraja N., Sriram S., Meenaa V., Srilakshmi K., Sasikumar C., and Rajeswari R. Phytochemical Screening and Antimicrobial Activity of the Plant Extracts of *Mimosa pudica* L. Against Selected Microbes. *Ethnobotanical Leaflets*, 2009, 5(22) : 5356-5359.

Gleńsk M., Włodarczyk M., Radom M., and Cisowski W. TLC as a Rapid and Convenient Method for Saponin Investigation, *Journal of Planar Chromatography*, 2005, 18 (2) : 167–170.

Gnanamani A., Hariharan P., and Satyaseela M. *Staphylococcus aureus*: Overview of Bacteriology, Clinical Diseases, Epidemiology, Antibiotic Resistance and Therapeutic Approach. *Frontiers in Staphylococcus aureus In Tech*, 2017, 1(1): 1-28.

Godstime O., Felix E., Augustina J., and Christopher E. Mechanisms of Antimicrobial Actions of Phytochemicals against Enteric Pathogens – A Review. *J Pharm Chem Biol Sci*, 2014, 2 (2) : 77-85.

Graham J.M., and Rickwood D. *Subcellular Fractination*, Oxford University Press, USA, 1997. p. 210-300.

Gunawan D., dan Mulyani S. *Ilmu Obat Alam (Farmakognosi) Jilid I*. Penebar Swadaya, Jakarta, 2004. hal. 35-50.

Gurung B. *The Medicinal Plants of the Sikkim Himalaya 1st edition*, Jasmin Bejoy Gurung, India, 2002. p. 50-100.

Hagerman A.E. Tannin Chemistry, Departmen of Chemistry and Biochemistry, Miami University, USA, 1998.

Harborne J. B. *Metode Fitokimia*, Institut Teknologi Bandung, Bandung, 1987. hal. 40-89.

Harris A., Sexton D.J., and Baron E.L. 2017. *Patient Education: Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) (Beyond The Basic)*, (Online), (<http://www.uptodate.com/contents/methicillin-resistant-staphylococcus-aureus-mrsa-beyond-the-basics>, diakses 24 April 2017).

Hatano T., Kusuda M., Inada K., Ogawa T. O., Shiota S., and Tsuchiya T. *Effects of Tannins and Related Polyphenols on Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*, 2005, 66 (17) : 2047-2055.

Hendayana S. *Kimia Pemisahan Metode Kromatografi dan Elektroforensis Modern*, PT. Remaja Rosdakarya, Bandung, 2006. hal. 34-55.

Houghton J.P., dan Raman A. *Laboratory Handbook for The Fractionation of Natural Extracts 1st ed*, Chapman & Hall, New York, 1998. p. 73-89.

Iskandar, Y. 2007. *Karakteristik Zat Metabolit Sekunder dalam Ekstrak Bunga Krisan (Chrysanthemum cinerariaefolium) sebagai Bahan Pembuatan Biopestisida*. Skripsi. Tidak diterbitkan, FMIPA, Semarang.

ITIS (Integrated Taxonomic Information System). 2017. *Taxonomic Hierarchy: Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, (Online), (<http://www.itis.gov>, diakses 25 November 2017).

Jawetz E., Melnick J.L., Adelbergs E.A., Brooks G.F., Butel J.S., dan Ornston L.N. 2005. *Mikrobiologi Kedokteran*, Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta. hal. 210-257.

Joseph B., George J., and Mohan J. Pharmacology and Traditional Uses of *Mimosa pudica*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, 2013, 5(2): 41-44.

Kadlec K., and Schwarz S. Identification of a Novel Trimethoprim Resistance Gene, *dfkK*, In a *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* ST398 Strain and Its Physical Linkage to The Tetracycline Resistance Gene *tet(L)*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(2):776-788.

Keng W. *Mimosa pudica: The DNA of Singapore*, (Online), (<http://lkcnhm.nus.edu.sg/dna/organisms/details/486>, diakses 24 April 2017).

Kusumaningtyas E., Astuti E., and Darmono. Sensitivitas Metode Bioautografi Kontak dan Agar Overlay dalam Penentuan Senyawa Antikapang. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 2008, 6 (20) : 75-79.

Lan S., Wu L., Zhang D., Hu C., and Liu Y. Ethanol Out Performs Multiple Solvents in The Extraction of Chlorophyll-A from Biological Soil Crusts, *Soil Biology and Biochemistry*, 2011, 43 (4) : 857-861.

Lowy F.D., *Staphylococcus aureus* Infections. *N. Engl. J. Med*, 1998, 3(39) :520-532.

Maatalah M.B., Bouzidi N.K., Bellahouel S., Merah B., Fortas Z., Soulimani R., et al. Antimicrobial Activity of The Alkaloids and Saponin Extracts of *Anabasis articulata*. *J. Biotechnol. Pharm. Res*, 2012, 3(3) : 54-57.

Mabry T.J., Markham K.R., and Thomas M.B. S. The Systematic Identification of Flavonoids, Springer Verlag, New York, 1970. p. 2204.

Maekawa E., Lilian., Roberta., Lamping., Sidnei., Marcacci., et al. Antimicrobial Activity of Chlorophyll-Based Solution on *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis*, *Revista Sul-brasiliera de Odontologia*, 2007, 4 (1): 37-40.

Matsuura HN., Fett-Neto AG. Plant Alkaloids: Main Features, Toxicity, and Mechanisms of Action. In: Gopalakrishnakone P., Carlini C., Ligabue-Braun R. (eds) *Plant Toxins. Toxinology*. Springer, Dordrecht, 2015. p. 200.

Mukhriani. Ekstraksi, Pemisahan Senyawa dan Identifikasi Senyawa Aktif, *Jurnal Kesehatan*, 2014, 7 : 361-367.

Newman H. *Staphylococcus aureus*. (Online), (<https://www.microbiologyinpictures.com/staphylococcus%20aureus.html>), diakses 25 November 2017).

Pacific Island Ecosystems at Risk (PIER). *Mimosa pudica Species Information*, (Online), ([http://www.hear.org/Pier/species/mimosa pudica.htm](http://www.hear.org/Pier/species/mimosa%20pudica.htm)), diakses 24 April 2017).

Pai V., Rao V.I., and Rao S.P., Prevalence and Antimicrobial Susceptibility Pattern of *Methicillin-resistant Staphylococcus Aureus [MRSA]* Isolates at a Tertiary Care Hospital in Mangalore, South India. *Journal of Laboratory Physicians*, 2010, 2(2) : 82-84.

Palwinder K., Nilesh K., Shivananda T.N., and Gagandeep K. Phytochemical Screening and Antimicrobial Activity of The Plant Extracts of *Mimosa pudica* L. against Selected Microbes. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2011, 5(22) : 5356-5359.

Panche AN., Diwan AD., Chandra SR. Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, 2016, 5(47) : 1-10.

Parker M.T., and Hewitt J.H., *Methicillin resistant Staphylococcus aureus*. *Lancet*, 1970, 295 (1) : 800–804.

Pincus D. Microbial Identification Using The Biomérieux Vitek ® 2 System, *Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods*, 2014, 2 (1), 1:50.

Rajendran R., and Sundararajan R. Preliminary Phytochemical Analysis and Anti-Bacterial Activity of *Mimosa Pudica* Linn Leaves. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2010, 1 (2) : 1-8.

Rakhmaningrum T. *The Morphological Characteristic of Mimosa pudica*. Skripsi. Tidak diterbitkan, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Malang, Malang. 2015.

Rambach, A. *Clinical Microbiology* (Online). <http://www.chromagar.com/clinical-microbiology-chromagar-mrsa-focus-on-mrsa-28.html>, diakses 24 April 2017).

Ranjan, R., Kumar S., Seethalakshmi., and Rao. Phytochemical Analysis of Leaves and Roots of *Mimosa Pudica* Collected from Kalingavaram Tamil Nadu, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 2013, 5 (5) : 53-55.

Rijai., L. Review of Potential Saponins Extract from Kolowe Fruit Seed (*Chydenanthus excelsus*) as Pharmaceuticals : A Wild And Rare Plants from Indonesia, *J. Pharm. Sci. & Res*, 2016, 8 (6) : 373-380.

Sahariah B. J., Sharma R. K., and Lahkar M. A Review on *Mimosa Pudica* with Specific Reference to Antimicrobial Activity. *Cibtech Journal of Microbiology*, 2016, 5 (3) : 1-5.

Sanaye M., Joglekar C.S., and Pagare N.P. *Mimosa* a Brief Overview. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2015, 4(2): 182-187.

Sari N.R.C., Wardana P.W.A., dan Indrayani A.W. 2015. Uji Zona Hambat Ekstrak Daun Putri Malu (*Mimosa Pudica*) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) secara *In Vitro*. Skripsi. Tidak diterbitkan, Universitas Udayana, Bali.

Savage GP. *Saponins*. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (Second Edition), edited by Benjamin Caballero, Academic Press, Oxford, 2003. p. 5095-5098.

Schwaber M.J., Carmeli Y. Mortality And Delay In Effective Therapy Associated With Extended-Spectrum Beta-Lactamase Production In Enterobacteriaceae Bacteraemia: A Systematic Review And Meta-Analysis. *J Antimicrob Chemother*, 2007, 60: 913-20.

Sherma J. *Basic TLC Techniques, Materials, and Apparatus*, dalam Sherma, J., Fried, B., (Eds.), *Handbook of Thin-Layer Chromatography*, Marcel Dekker Inc, New York, 2003. p. 68-90.

Simbala H.E.I. Analisis Senyawa Alkaloid Beberapa Jenis Tumbuhan Obat sebagai Bahan Aktif Fitofarmaka, *Pasific Journal*, 2009, 1(4) : 489-494.

Skoog D. A. *Principles of Instrumental Analysis*, Third Ed, Saunde College Publishing, New York, 1985. p.108-132.

Soegiharjo C. J. *Farmakognosi*. Citra Aji Parama, Yogyakarta, 2013. hal. 78-85.

Soleha U . Uji Kepekaan terhadap Antibiotik. *Juke Unila*, 2015, 5 (9) : 1-10.

Stahl, E. *Analisis Obat secara Kromatografi dan Mikroskopi Edisi Terjemahan* (diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata, Iwang Soediro). ITB press, Bandung, 1985. hal 70-98.

Sudjadi. *Metode Pemisahan*. Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, 1988. hal. 34-77.

Sulaiman S.F., Sajak A.A.B., Ooi K.L., Supriatno., and Seow E.M. Effect of Solvents in Extracting Polyphenols and Antioxidants of Selected Raw Vegetables. *J Food Compos Anals*, 2011, 1(24) : 506-515.

Sulistyaningsih. *Uji Kepekaan Beberapa Sediaan Antiseptik terhadap Bakteri Staphylococcus aureus dan Staphylococcus aureus Resisten Metisilin (MRSA)*. Tesis. Tidak diterbitkan, Universitas Padjajaran, Bandung. 2010.

Sulistyo J., dan Soeka Y.S. Bioproses Enzimatik dan Uji Hayati Polifenol Glikosida sebagai Senyawa Antimikroba dan Antimelanogenesis. *Prosiding Seminar Nasional Kimia Bahan Alam*. Universitas Indonesia-UNESCO, Jakarta, 1999. Hal 90-110.

Sumiwi S.A., Muhtadi A., Marline A., Zuhrotun A., Tjitraresmi A., Femmy Y., et al. *Penetapan Parameter Standarisasi Ekstrak Herba Putri Malu (Mimosa pudica Linn.) dan Uji Toksisitas Akutnya pada Mencit*. Makalah disampaikan pada Seminar and Workshop "The 1st Indonesia Conference on Clinical Pharmacy", 6-7 November 2013, Bandung.

Supardi., dan Sukamto. *Mikrobiologi Dalam Pengolahan dan Keamanan Produk Pangan*. Penerbit Alumni, Bandung, 1999. Hal. 55-83.

Susanti A. D., Ardiana D., Gumelar P. G., dan Yosephin B. G. *Polaritas Pelarut sebagai Pertimbangan dalam Pemilihan Pelarut untuk Ekstraksi Minyak Bekatul dari Bekatul Varietas Ketan (Oriza sativa glatinosa)*. Makalah disampaikan pada Simposium Nasional RAPI XI FT UMS, 2012, Surakarta.

Susilo B., dan Yulianingsih R. Pengaruh Lama Ekstraksi dan Konsentrasi Pelarut Etanol terhadap Sifat Fisika-Kimia Ekstrak Daun Stevia (*Stevia rebaudiana bertonii* M.) dengan Metode *Microwave Assisted Extraction (MAE)*, *Jurnal Bioproses Komoditas Tropis*, 2014, 2 (1) : 1-10.

Tambellini N.P., Zaremborg V., Turner R.J., Welji A.M. Evaluation of Extraction Protocols for Simultaneous Polar and Non-Polar Yeast Metabolite Analysis Using Multivariate Projection Methods. *Metabolites*, 2013, 3, 592 : 605.

Tamilarasi T., and Ananthi T. Phytochemical Analysis and Anti Microbial Activity of *Mimosa pudica* Linn. *Res. J. Chem. Sci*, 2012, 2 (2) : 72-74.

Tiwari P., Bimlesh K., Mandeep K., Gurpreet K., and Harleen K. Phytochemical Screening and Extraction: A Review. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, 2011, 1 (1) : 1-8.

Tomar S., Shrivastava V., and Kaushik S. In Vitro Efficacy of Methanolic Extract of *Mimosa pudica* against Selected Micro-organisms for Its Broad Spectrum Antimicrobial Activity. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, 2014, 3(4): 780-784.

Udobi C.E., Obajuluwa A. F., and Onalapo J. A. Prevalence and Antibiotic Resistance Pattern of *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* from an Orthopaedic Hospital in Nigeria. *BioMed Research International*, 2013, 1(1) : 1-4.

Vaidyaratnam, P. *Indian Medicinal Plants Database 1st edn.* Orient Longman, Arya Vidyashala, Kottakkal II, 2001. hal. 10-11.

Wagner H.,S. Bladt., and Zgainski EM. *Plant Drugs Analysis*, Springer Verlag, Berlin, 1984. p. 60-85.

Watanakunakorn C. Mode of Action and In-Vitro Activity of Vancomycin. *J Antimicrob Chemother*, 1984, 1(1): 7-18.

WHO. *WHO Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance*. World Health Organization, Geneva, 2001. p. 9-11.

Wijaya P.R. Uji Kepekaan Bakteri *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* terhadap Antibiotik Vancomycin dengan Metode *Macrobroth Dilution*.

Skripsi. Tidak diterbitkan, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. 2014.

Wong H., Louie L., Watt C., Sy E., Lo R., Mulvey MR., et.al., Characterization of *ermA* in Macrolide-Susceptible Strains of *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(8) : 36-50.

Yulianti D., Susilo B., Yulianingsih R. *Pengaruh Lama Ekstraksi dan Konsentrasi Pelarut Etanol terhadap Sifat Fisika-Kimia Ekstrak Daun Stevia (Stevia Rebaudiana Bertoni M.) dengan Metode Microwave Assisted Extraction (MAE)*. Skripsi. Tidak diterbitkan, Jurusan Keteknikan Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Brawijaya, Malang. 2014.

