

Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Pohpohan (*Pilea trinervia* W.) Terhadap *Escherichia coli* Dan *Staphylococcus aureus*

Antibacterial Activities Ekstrak Pohpohan Leaves (*Pilea trinervia* W.) Against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*

Abdulloh Khudry¹, B.Boy Rahardjo Sidharta², P. Kianto Atmodjo³
Program Studi Teknobiologi Industri, Fakultas Teknobiologi
Universitas Atma Jaya Yogyakarta
d_d_here@ymail.com

Abstrak

Pohpohan (*Pilea trinervia* W.) berpotensi menjadi antimikrobia. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui ekstrak daun pohpohan dalam menghambat *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*, mengetahui pelarut yang menghasilkan ekstrak dengan aktivitas antibakteri paling tinggi terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*, dan mengetahui Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dari ekstrak daun *Pilea trinervia* W. Ekstrak daun *Pilea trinervia* W. diekstrak secara maserasi dengan pelarut metanol, etil asetat, dan n-heksana. Hasil ekstrak dipekatkan dan diujikan pada mikrobial uji menggunakan metode difusi dengan mengukur zona hambat yang terbentuk. Hasil penelitian menunjukkan ekstrak *Pilea trinervia* W tidak efektif terhadap bakteri Gram negatif, namun aktif terhadap bakteri Gram positif. Ekstrak etil asetat menunjukkan hasil yang terbaik dengan rata-rata zona hambat 0,1545 cm². Nilai Hasil penentuan KHM menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat dengan kadar 50 % efektif terhadap bakteri Gram positif, sedangkan bakteri Gram negatif tidak efektif.

Kata kunci : Daun Pohpohan, Ekstrak, Antimikrobia, Zona Hambat

Abstract

Pohpohan (*Pilea trinervia* W.) have a potential to be antimicrobial. This research have a purpose to make sure about inhibitory effect for *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* from pohpohan leaf's extract, to find out which solven can make a highest inhibitory effect for *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, and to find out Minimum Inhibitory Concentration (MIC) from pohpohan leaf's extract. Ekstraktion of pohpohan leaf's using maseration method with three different solven (methanol, ethyl acetate, and n-hexane). Evaporation solven from ekstrak using Rotary evaporation method, and activities of antibacterial was tested with disk diffusion method. Result from this research show, ekstrak from *Pilea trinervia* leaf's did not work for Gram negative bacteria, but work for Gram positive bacteria. Ethyl acetate ekstrak showing the best result with average of inhibitory effect is 0.1545 cm². Result from MIC was ethyl acetate ekstrak from *Pilea trinervia* leaf's with 50 % ekstrak effective for Gram positive bacteria, but not effective against Gram negative bacteria.

Keyword : Pohpohan leafs, Ekstrak, Antibacterial, Inhibitory effect

Pendahuluan

Indonesia merupakan negara agraris yang mempunyai keanekaragaman hayati yang sangat tinggi, sehingga menghasilkan sayuran dengan jenis dan jumlah yang banyak. Menurut Peoloengan dkk. (2006), upaya untuk memberikan nilai tambah dari tanaman yang masih liar salah satunya dengan dilakukan penelitian terhadap kandungan kimia serta khasiatnya.

Penelitian berupa pengujian fitokimia dan uji aktivitas biologisnya seperti antimikrobia sangat perlu untuk dilakukan. Antimikrobia merupakan senyawa kimia yang berfungsi untuk mengontrol pertumbuhan mikroorganisme yang tidak diinginkan. Antimikrobia meliputi antibakteri, antiprotozoal, antifungi, dan antivirus. Antibakteri termasuk ke dalam antimikrobia yang digunakan untuk menghambat pertumbuhan bakteri (Perry dkk., 2002; Schunack dkk., 1990).

Pohpohan atau yang dikenal dengan nama ilmiah *Pilea trinervia* Wight, termasuk dalam tumbuhan terna dengan tinggi mencapai 2 meter. Helaiian daun berbentuk bulat meruncing, bersifat lunak dan berbau khas yang biasanya digunakan untuk sakit perut (Balaikliring Kehati Jawa Barat, 2009; Heyne, 1987; Siemonsma dan Piluek, 1994; van Steenis, 2010). Menurut Wistreich (1999),

sakit perut dapat disebabkan oleh adanya bakteri-bakteri merugikan baik dari luar tubuh maupun bakteri yang ada dalam saluran pencernaan. Bakteri penyebab penyakit saluran pencernaan yang berada dalam saluran pencernaan dan di luar tubuh salah satunya adalah *Escherichia coli* yang bersifat Gram negatif dan *Staphylococcus aureus* yang bersifat Gram positif.

Kandungan fitokimia daun pohpohan menurut penelitian Amalia dkk. (2006), dengan menggunakan ekstraksi bertingkat menggunakan pelarut n-heksana, etil asetat, dan etanol, terdiri dari golongan steroid atau triterpenoid, alkaloid, dan flavonoid. Senyawa hasil ekstraksi daun pohpohan merupakan golongan alkaloid yang mempunyai gugus $>NH$, $-CH_3$, $-CH_2$, $>C=O$, $>C=C<$ dan memiliki ikatan rangkap terkonjugasi, sehingga daun pohpohan kemungkinan memiliki aktivitas antimikrobia.

Dwiyani (2008), dalam penelitiannya melaporkan adanya aktivitas antioksidan ekstrak daun pohpohan menggunakan pelarut metanol dan ekstraksi metanol dengan tambahan karbon aktif. pada konsentrasi 350 ppm, yang merupakan senyawa steroid dan triterpenoid.

Menurut Endrini (2011), ekstrak daun pohpohan dengan menggunakan metanol 95%, memiliki kemampuan antioksidan walaupun tidak sebesar sampel lainnya (rumput mutiara). Ekstrak daun pohpohan tidak memiliki kemampuan sebagai antikarsinogenik terhadap aktivitas kanker payudara yang dipengaruhi hormone (MCF-7) dengan menggunakan metode MTT (*microculture tetrazolium salt*).

Penggunaan ekstrak daun pohpohan belum diteliti keefektifannya terhadap aktivitas antimikrobia sampai saat ini. Selama ini penggunaan daun pohpohan hanya diuji untuk dilihat aktivitas antioksidannya saja seperti penelitian yang dilakukan Dwiyani (2008) dan Endrini (2011). Penelitian ini bertujuan untuk : (1) Mengetahui ekstrak daun *Pilea trinervia* W dalam menghambat *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. (2) Mengetahui pelarut yang menghasilkan ekstrak dengan aktivitas antibakteri paling tinggi terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. (3) Mengetahui Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dari ekstrak daun *Pilea trinervia* W.

Metode Penelitian

Bahan dan alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain daun pohpohan segar sebanyak 1 kg yang berasal dari perkebunan Ibu Ade yang berada di Tamansari, Ciapus-Bogor, isolat *Escherichia coli*, dan *Streptococcus aureus*, ampicilin 500 mg, etil asetat teknis, n-heksan teknis, methanol, akuades steril, alkohol 70%, medium *Nutrient Agar*, medium *Nutrient Broth*, pati, cat Gram A, cat Gram B, cat Gram C, cat Gram D, cat nigrosin, minyak emersi, H_2O_2 3%, medium glukosa cair, medium sukrosa cair, medium laktosa cair, larutan *phenol red*, medium casein, eter, larutan erlich, deterjen, akuades, metanol 30%, kloroform, amoniak, larutan Dragendorf, larutan Meyer, larutan Wagner, eter, larutan Lieberman, dan asetat anhidrat.

Tahapan dan perlakuan penelitian

Penelitian dilakukan secara bertahap meliputi tahap :

1. Penentuan waktu pengeringan daun pohpohan

Penentuan waktu pengeringan daun pohpohan dilakukan dengan suhu optimal pengeringan daun menggunakan oven adalah $40^{\circ}C$ (Rivai dkk., 2010). Pada proses pengeringan dilakukan pengamatan setiap 2 jam sekali dengan mengurangi berat awal sebelum dikeringkan dengan berat setelah kering. Dalam menentukan berat kering, proses pengeringan dilakukan sampai berat yang hilang tidak mengalami perubahan yang signifikan.

2. Pembuatan serbuk daun pohpohan (Rivai dkk., 2010)

Daun pohpohan yang akan digunakan dicuci untuk menghilangkan kotoran kemudian ditiriskan. Daun pohpohan dikeringkan menggunakan oven pada suhu $40^{\circ}C$ selama 9 jam. Daun yang telah kering kemudian dibuat serbuk menggunakan blender.

3. Ekstraksi (Korompis dkk., 2010 dengan modifikasi)

Serbuk daun pohpohan sebanyak 50 gram direndam pelarut n-heksan, etil asetat, dan metanol masing-masing 500 ml (perbandingan 1:10 (w/v)) direndam selama 24 jam, kemudian

disaring sehingga diperoleh filtrat I dan debris I. Debris I dimaserasi kembali dalam pelarut dengan perbandingan 1:10 (w/v) selama 24 jam. Setelah itu, disaring lagi untuk mendapatkan filtrat II dan debris II. Hal yang sama dilakukan untuk memperoleh debris III. Selanjutnya, filtrat I, II, dan III digabungkan kemudian pelarut diuapkan menggunakan *rotary evaporator*. Suhu yang digunakan untuk proses penguapan menggunakan *rotary evaporator* sebesar 65 °C untuk pelarut heksana, 75 °C untuk pelarut etil asetat dan 60 °C untuk pelarut metanol. Suhu yang digunakan mendekati titik didih dari masing-masing pelarut.

4. Identifikasi kandungan kimia tumbuhan (Harborne, 1987)
 - a. Uji Flavonoid

Ekstrak daun pohpohan sebanyak 0,1 g ditambahkan dengan 5 ml metanol 30 % kemudian dipanaskan selama 5 menit. Filtrat ditambahkan dengan H₂SO₄. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya perubahan warna menjadi merah setelah ditambahkan H₂SO₄, kemudian difoto.
 - b. Uji Alkaloid

Ekstrak daun pohpohan sebanyak 0,1 g ditambah dengan 5 ml kloroform dan 3 tetes amoniak. Fraksi kloroform dipisahkan dan diasamkan dengan 2 tetes H₂SO₄ 2M. Fraksi asam dibagi menjadi 3 tabung yang masing-masing ditambah pereaksi Dragendorf, Meyer, dan Wagner. Alkaloid pada sampel ditandai dengan adanya endapan putih pada pereaksi Meyer, endapan merah pada pereaksi Dragendorf, dan endapan coklat pada pereaksi Wagner, kemudian difoto.
 - c. Uji Triterpenoid dan Steroid

Ekstrak daun pohpohan sebanyak 0,1 g ditambah 5 ml etanol 30 % kemudian dipanaskan selama 5 menit, kemudian didinginkan dan disaring. Filtrat diuapkan, kemudian ditambah larutan eter. Lapisan eter ditambah dengan pereaksi Lieberman Burchard (3 tetes asetat anhidrat dan 1 tetes H₂SO₄ pekat). Perubahan warna menjadi merah atau ungu menandakan adanya triterpenoid sedangkan warna hijau menandakan steroid, kemudian difoto.
5. Pembuatan kurva standar bakteri (Handayani dkk. 2006 dengan modifikasi).

Tabung reaksi sebanyak enam masing-masing diisi starter bakteri uji dan medium *nutrient broth* dengan perbandingan 0:6; 1:5; 2:4; 3:3; 4:2; 5:1. Kultur bakteri diukur absorbansinya dengan panjang gelombang optimum masing-masing bakteri (*E. coli* $\lambda = 580-630$ nm, *S. aureus* $\lambda = 580-630$ nm), selanjutnya dilakukan perhitungan *total plate count* (TPC) pada masing-masing tabung reaksi dan dilakukan perhitungan untuk mendapatkan rumor regresi linearnya.
6. Pengukuran kurva pertumbuhan bakteri (Johnson dan Case, 2010 dengan modifikasi)

Kultur mikrobial diambil sebanyak 10 ml dan diinokulasikan ke dalam medium NA cair 100 ml, kemudian diinkubasi selama 24 jam. Pada saat inkubasi, setiap 2 jam dilakukan pengukuran absorbansi dengan spektrofotometer. Pengukuran absorbansi dilakukan pula pada medium NA tanpa bakteri yang disebut kontrol, kemudian medium NA setelah diinokulasi bakteri sebagai 0 jam, dengan panjang gelombang optimum masing-masing bakteri (*E. coli* $\lambda = 580-630$ nm, *S. aureus* $\lambda = 580-630$ nm) dan dilakukan perhitungan *total plate count* (TPC) pada kultur bakteri dari 0 jam sampai 24 jam, setiap 2 jam (Kusmiati, dan Agustini, 2006; dan Dewi, 2010).
7. Uji antibakteri berdasarkan zona hambat dengan *paper disk* (Waluyo, 2010)

Kultur mikrobial diambil 0,1 ml diinokulasikan pada medium NA dengan metode *spread plate*. *Paper disk* ditetesi ekstrak daun pohpohan kemudian diletakkan di atas medium sebanyak 4-6 *paper disk* secara simetri dengan jarak paling kecil 20 mm dari tepi cawan petri. Kemudian diinkubasi selama 16-18 jam dengan suhu 37 °C. Setelah diinkubasi, zona hambat yang terjadi diamati, diukur dan difoto. Kemudian sebagai pembanding digunakan antibiotik ampisilin yang dilihat zona hambatnya pada mikrobial uji. Luas zona hambat dapat dihitung dengan menggunakan rumus berikut:

$$\text{Luas Zona Hambat} \\ = 3,14 \left(\frac{d_2 - d_1}{2} \right)^2 \text{ (dalam cm}^2\text{)}$$

$$d_2 = \frac{d_{\text{terpanjang}} + d_{\text{terpendek}}}{2}$$

Keterangan:

d1 : diameter kertas saring (cm)

d2 : rata-rata diameter zona hambat (cm)

8. Pengukuran Konsentrasi Hambat Minimum (Cappucino dan Sherman, 2011 dengan modifikasi)

Pengukuran Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dapat dilakukan dengan menggunakan metode seri pengenceran. Tabung reaksi disiapkan 8 buah untuk setiap pengenceran ekstrak. Masing-masing tabung reaksi diberi label dari 1 sampai 8 pada masing-masing seri pengenceran ekstrak, kemudian ditambahkan pelarut yang sesuai dengan ekstrak masing-masing sebanyak 9 ml dari tabung reaksi no 2 sampai 8.

Ekstrak daun pohpohan yang sudah dipekatkan dengan *rotary evaporator* dianggap memiliki konsentrasi 100%. Ekstrak daun pohpohan 100% dimasukkan ke dalam tabung no 1 sebanyak 10 ml, kemudian diambil dan ditambahkan sebanyak 1 ml ke dalam tabung 2 dan dihomogenkan dengan *vortex*. Dilakukan pengenceran konsentrasi hingga mendapat konsentrasi 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,625, 1,8125, dan 0,90625% dengan cara: 1 ml larutan pada tabung 2 diambil dan dimasukkan ke dalam tabung 3 kemudian divortex. Larutan dari tabung 3 diambil 1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung 4 kemudian divortex, langkah ini diulang hingga sampai pada tabung 8. Pada tabung 8, 1 ml larutan dibuang agar volume total setiap tabung adalah 9 ml.

Kultur mikrobial diambil 0,1 ml diinokulasikan pada medium NA dengan metode *spread plate*. *Paper disk* ditetesi ekstrak daun pohpohan kemudian diletakkan di atas medium sebanyak 4-6 *paper disk* secara simetri dengan jarak paling kecil 20 mm dari tepi cawan petri. Kemudian diinkubasi selama 16-18 jam dengan suhu 37 °C. Setelah diinkubasi, zona hambat yang terjadi diamati, diukur dan difoto.

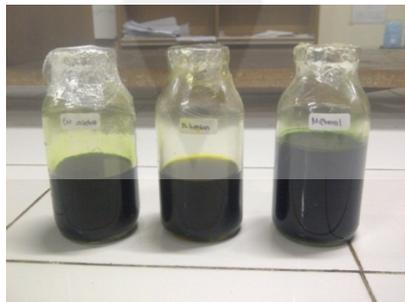
9. Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan ANAVA dengan tingkat kepercayaan sebesar 95%. Apabila hasil ANAVA menunjukkan hasil yang beda nyata, analisis dilanjutkan dengan *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) untuk mengetahui beda nyata antara perlakuan (Gazpers, 1994). Analisis ANAVA dan DMRT dilakukan dengan menggunakan program SPSS 15.0.

Hasil dan Pembahasan

Warna Ekstrak

Larutan ekstrak daun pohpohan yang telah dimaserasi kemudian dievaporasi dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 75 °C. Proses evaporasi dilakukan hingga menghasilkan cairan pekat ekstrak daun pohpohan kurang lebih sebanyak 25 ml. Hasil evaporasi dari ketiga ekstrak dengan perbedaan pelarut menunjukkan tidak adanya perbedaan warna dari ekstrak metanol dan ekstrak etil asetat yang berwarna hijau tua, sedangkan perbedaan warna ditunjukkan oleh ekstrak n-heksan yang sebelumnya berwarna hijau muda menjadi kekuningan (Gambar 1).



Gambar 1. Hasil evaporasi ekstrak daun pohpohan (dari kiri ke kanan : ekstrak etil asetat, n-heksan, dan metanol)

Pengujian Fitokimia Ekstrak

Pada Penelitian ini ekstrak yang didapatkan dari hasil maserasi dan evaporasi daun pohpohan dari ketiga pelarut dilakukan pengujian senyawa kimia secara kualitatif. Pengujian senyawa kimia ekstrak daun pohpohan meliputi pengujian flavonoid, alkaloid, triterpenoid dan steroid. Hasil pada pengujian senyawa kimia ekstrak daun pohpohan dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Pengujian Senyawa Kimia Ekstrak Daun Pohpohan

Pelarut	Flavonoid	Alkaloid			Triterpenoid atau Steroid
		Mayer	Dragendroff	Wagner	
Metanol	-	+	-	+	Steroid
Etil Asetat	-	+	-	+	Steroid
N-heksan	-	-	+	+	-

Keterangan : + = Menunjukkan terdapat senyawa tersebut
- = Menunjukkan tidak terdapat senyawa tersebut

Hasil pengujian senyawa kimia dari ekstrak daun pohpohan pada ketiga pelarut menunjukkan tidak ditemukannya senyawa flavonoid, yang ditunjukkan dengan tidak ditemukannya warna merah setelah diberikan perlakuan. Hasil ini diakibatkan oleh terdapatnya perlakuan pemanasan pada saat pengeringan daun dan pemekatan ekstrak menggunakan *rotary evaporator*, dengan demikian pembuatan ekstrak harus mengurangi penggunaan panas seperti penggunaan metode kromatografi. Menurut Koirewoa dkk. (2012) dan Rompas dkk. (2012), senyawa flavonoid adalah senyawa yang tidak tahan panas, selain itu senyawa flavonoid mudah teroksidasi pada suhu tinggi.

Pengujian alkaloid ekstrak daun pohpohan pada ketiga pelarut menunjukkan hasil positif, ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih pada saat diberikan pereaksi Meyer, endapan merah pada saat diberikan pereaksi Dragendorf, atau endapan coklat pada saat diberikan pereaksi Wagner. Prinsip dari metode analisis ini adalah reaksi pengendapan yang terjadi karena adanya pergantian ligan. Atom nitrogen yang mempunyai pasangan elektron bebas pada alkaloid dapat mengganti ion iodo dalam pereaksi-pereaksi. Pereaksi Meyer mengandung kalium iodida dan merkuri klorida [Kalium tetraiodomercurat (II)], pereaksi Dragendorf mengandung bismuth nitrat dan kalium iodide dalam larutan asam asetat galsial [Kalium tetraiodobismutat (III)], sedangkan pereaksi Wagner mengandung iodo dan kalium iodida (Sangi, dkk., 2008). Menurut Sastrohamidjojo (1996), berbagai pereaksi menunjukkan perbedaan sensitivitas terhadap gugus alkaloid yang berbeda, perbedaan hasil yang terjadi pada setiap pereaksi diakibatkan oleh kesanggupan alkaloid untuk bergabung dengan logam berat seperti merkuri, bismuth, tungsten atau iodin.

Pengujian steroid dan triterpenoid ekstrak daun pohpohan pada pelarut metanol dan etil-asetat menunjukkan adanya senyawa steroid, sedangkan pada pelarut n-heksan tidak terdapat steroid maupun triterpenoid. Prinsip ini berdasarkan pada kemampuan senyawa triterpenoid dan steroid membentuk warna jika direaksikan dengan H_2SO_4 pekat dalam pelarut asam asetat anhidrat (pereaksi Lieberman Burchard) (Sangi, dkk., 2008). Hasil positif pada analisis ini ditunjukkan dengan terjadinya perubahan warna menjadi merah atau ungu yang menandakan adanya triterpenoid, sedangkan terjadi perubahan warna menjadi hijau yang menandakan adanya steroid (Harborne, 1987).

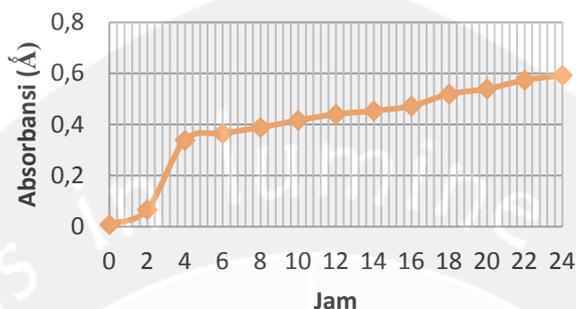
Kurva Pertumbuhan Bakteri Uji

Pada penelitian ini dilakukan perhitungan kurva pertumbuhan dari bakteri uji untuk mengetahui jumlah dari bakteri sebelum bakteri uji digunakan untuk pengujian zona hambat dan pengujian konsentrasi hambat minimum. Menurut Mulyati (2009), pada pengujian aktivitas antibakteri inokulum bakteri yang digunakan berjumlah 10^7 cfu/ml, sedangkan menurut Hermawan dkk. (2007) syarat jumlah bakteri uji untuk pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi adalah 10^5 - 10^8 cfu/ml.

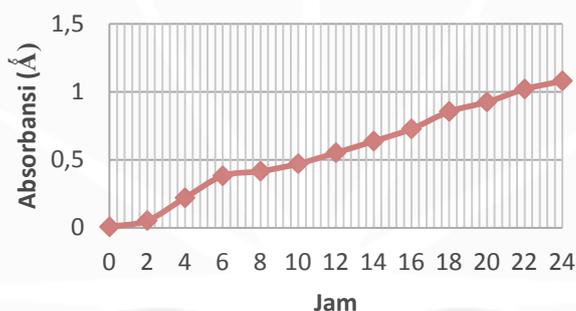
Kurva pertumbuhan bakteri uji pada penelitian ini dilakukan dengan metode turbidimetri. Menurut Jannah, dan Suryadinata (2012), kurva pertumbuhan bakteri dapat diperoleh dengan metode turbidimetri, yaitu mengukur densitas optik pada panjang gelombang optimum bakteri uji, dengan pengukuran panjang gelombang bakteri uji dilakukan selama 24 jam dengan selang waktu 2 jam. Prinsip dasar metode turbidimetri adalah, jika cahaya mengenai sel, maka cahaya akan dipantulkan dan cahaya yang tidak mengenai sel akan diteruskan. Jumlah cahaya yang diteruskan berbanding lurus

dengan transmittan, sedangkan cahaya yang dipantulkan berbanding terbalik dengan transmittan atau berbanding lurus dengan absorbansi.

Melihat hasil pengukuran densitas optik atau absorbansi bakteri uji *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* (Gambar 2, dan Gambar 3), dapat diketahui bahwa pada jam ke-0 sampai ke-2, bakteri uji baik *Escherichia coli* maupun *Staphylococcus aureus* mengalami fase adaptasi atau lag, hal ini dapat dilihat dari peningkatan absorbansi yang tidak terlalu tinggi. Setelah mengalami fase lag kedua bakteri uji mengalami fase eksponensial yang dapat dilihat dengan peningkatan nilai absorbansi pada jam ke-2 sampai ke-24.



Gambar 2. Kurva Waktu Vs Absorbansi bakteri *Escherichia coli*



Gambar 3. Kurva Waktu Vs Absorbansi bakteri *Staphylococcus aureus*

Untuk mengetahui jumlah bakteri uji yang akan digunakan pada pengujian anktivitas antibakteri, dilakukan pembuatan kurva standar bakteri uji, dengan menumbuhkan bakteri uji pada media *nutrient* agar yang sebelumnya dilakukan pengenceran inokulum bakteri uji menggunakan medium *nutrient broth* (0:6; 1:5; 2:4; 3:3; 4:4; 5:1) sehingga didapatkan jumlah koloni setiap pengenceran. Berdasarkan perhitungan jumlah koloni pada kurva standar bakteri uji, dapat diketahui persamaan untuk bakteri *Escherichia coli* adalah $Y = 0,13577336 + 3,0602067 \times 10^{-11}X$, dan persamaan untuk bakteri *Staphylococcus aureus* adalah $Y = 0,111525919 + 3,247163093 \times 10^{-11}X$. Persamaan bakteri-bakteri digunakan sebagai pendekatan dalam menentukan jumlah bakteri yang ada pada starter bakteri yang akan diujikan. Hasil dari perhitungan kedua bakteri uji menunjukkan bahwa jumlah bakteri uji pada starter dengan usia 4 jam sudah dapat digunakan sebagai bakteri uji karena sudah mencapai nilai yang ditentukan yaitu 10^7 (Mulyati, 2009).

Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Pohpohan

Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak daun pohpohan terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* menggunakan metode difusi agar dengan kertas saring berdiameter 0,6 cm. Pengujian ini bertujuan untuk melihat kemampuan ekstrak daun pohpohan dengan variasi pelarut (n-heksana, etil asetat, dan metanol) dalam menghambat pertumbuhan *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* yang dilihat dari zona bening yang ditimbulkan.

Hasil zona hambat yang dihasilkan oleh ekstrak daun pohpohan, kontrol pelarut dan kontrol positif (ampisilin) kemudian dilakukan analisis variasi (ANOVA) menggunakan SPSS, dengan tingkat kepercayaan 95%. Hasil analisis variasi, diketahui adanya beda nyata hasil dari variasi yang ada. Dengan diketahui adanya beda nyata yang dihasilkan oleh variasi, analisis data kemudian dilanjutkan

dengan uji DMRT untuk melihat variasi yang memberikan pengaruh terbaik. Hasil uji Duncan, menunjukkan bahwa ekstrak dengan pelarut etil asetat dan kontrol positif berupa ampisilin memberikan pengaruh terbaik atau zona penghambatan terbaik (Tabel 2).

Pada Tabel 2 dapat diketahui bahwa daya penghambatan ekstrak etil asetat merupakan yang terbaik dengan rata-rata luas zona hambat pada kedua bakteri uji adalah 0,1545 cm², setara dengan kontrol ampisilin yang memiliki rata-rata luas zona hambat pada kedua bakteri uji adalah 0,1314 cm². Sedangkan ekstrak metanol menunjukkan kemampuan yang lebih kecil (0,0819 cm²), dan diikuti dengan ekstrak n-Heksana yang memiliki kemampuan terkecil (0,0489 cm²).

Menurut Owoyale dkk. (2005) aktivitas antimikrobia pada tanaman berhubungan dengan kehadiran senyawa kimia seperti alkaloid, fenol, flavonoid, saponin, steroid, dan tanin. Hasil dari pengujian DMRT menunjukkan ekstrak dengan menggunakan etil asetat memiliki kemampuan yang terbaik. Hal ini dapat disebabkan oleh kemampuan pelarut dalam menarik senyawa kimia yang terkandung dalam daun pohpohan. Seperti yang dilaporkan Kusumaningtyas dkk. (2008) dan Shitit dkk. (1999), etil asetat merupakan pelarut semi polar, sehingga pelarut dapat melarutkan atau menarik senyawa kimia tanaman yang bersifat polar dan non-polar.

Tabel 2. Hasil DMRT luas zona hambat (cm²) aktivitas antibakteri ekstrak daun pohpohan dengan variasi pelarut, kontrol pelarut dan kontrol ampisilin terhadap mikrobia uji *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

Perlakuan	Luas Zona Hambat (cm ²)		Rata-rata
	<i>E. coli</i>	<i>S.aureus</i>	
Ekstrak Metanol	0,0096 ^a	0,1544 ^c	0,0819 ^C
Ekstrak Etil-asetat	0,0194 ^a	0,2895 ^d	0,1545 ^D
Ekstrak n-Heksana	0,0048 ^a	0,0930 ^b	0,0489 ^{BC}
Metanol	0,0096 ^a	0,0200 ^a	0,0145 ^{AB}
Etil-asetat	0 ^a	0,0291 ^a	0,0148 ^{AB}
n-Heksana	0 ^a	0 ^a	0 ^A
Ampisilin	0 ^a	0,2628 ^d	0,1314 ^D
Rata-rata	0,0062 ^A	0,1212 ^B	0,0637

Keterangan : Angka yang diikuti dengan huruf yang sama pada kolom dan baris yang sama menunjukkan tidak beda nyata pada tingkat kepercayaan 95%.

Hasil pengujian fitokimia yang telah dilakukan pada Tabel 1, diketahui bahwa pelarut etil asetat dapat melarutkan beberapa senyawa dari daun pohpohan antara lain steroid dan alkaloid. Senyawa fitokimia seperti alkaloid dan steroid dapat menjadi senyawa antimikrobia dengan menghambat biosintesis asam nukleat, dengan mengakumulasi di dalam bakteri dan mengubah komponen penyusun sel bakteri itu sendiri (Mc Charty dkk., 1992; Siregar, dkk., 2012).

Pada penelitian ini digunakan dua bakteri uji yaitu *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Hasil pengujian zona hambat ekstrak daun pohpohan, kontrol pelarut dan kontrol positif berupa ampisilin, menunjukkan bahwa bakteri *Escherichia coli* memiliki kemampuan bertahan lebih baik daripada bakteri *Staphylococcus aureus*, yang ditunjukkan dengan sedikitnya zona hambat yang dihasilkan oleh ekstrak daun pohpohan, kontrol pelarut, dan kontrol ampisilin. Hal ini dapat dilihat dari Tabel 2, bahwa rata-rata zona hambat yang dihasilkan pada pengujian dengan menggunakan bakteri *Escherichia coli* adalah 0,0062 cm², sedangkan pada *Staphylococcus aureus* luas zona hambat yang dihasilkan lebih besar yaitu 0,1212 cm².

Menurut Farag dkk. (1989), umumnya kelompok bakteri Gram positif lebih peka terhadap senyawa yang memiliki aktivitas antimikrobia dibandingkan dengan Gram negatif. Perbedaan sensitifitas bakteri Gram positif dan Gram negatif dapat disebabkan oleh perbedaan struktur dinding sel yang dimiliki oleh masing-masing bakteri (Lathifah, 2008).

Kekebalan atau resistensi bakteri *Escherichia coli* diakibatkan oleh permeabilitas yang tinggi pada dinding selnya, sehingga zat aktif yang terkandung dalam ekstrak tidak dapat masuk ke dalam sel bakteri, akibatnya bakteri Gram negatif seperti *Escherichia coli* pertumbuhannya tidak terhambat (Masduki, 1996). Menurut Dewi (2010) dan Titis dkk. (2013), senyawa polar seperti alkaloid yang terkandung dalam ekstrak akan lebih mudah menembus lapisan peptidoglikan yang dimiliki bakteri

Gram positif seperti *Staphylococcus aureus* yang bersifat polar, daripada lapisan lipid yang bersifat nonpolar seperti yang ada pada bakteri Gram negatif yang dimiliki bakteri *Escherichia coli*.

Konsentrasi Hambat Minimum Ekstrak Optimum Daun Pohpohan

Menurut (Cappuccino dan Sherman, 2011), konsentrasi hambat minimum merupakan konsentrasi terendah dari senyawa antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan mikrobia uji. Dengan diketahuinya ekstrak terbaik yang memberikan kemampuan antibakteri adalah ekstrak dengan pelarut etil asetat, maka dilakukan pengujian terhadap ekstrak tersebut. Jika ekstrak dari etil asetat dianggap sebagai 100% maka dilakukan pengenceran terlebih dahulu terhadap ekstrak tersebut dengan menambahkan pelarut etil asetat.

Hasil pengukuran zona hambat kemudian dihitung sehingga menunjukkan bahwa pengenceran terendah yang masih menimbulkan zona hambat adalah konsentrasi 6,25% pada bakteri *Staphylococcus aureus*. Sedangkan pada bakteri *Escherichia coli* konsentrasi terendah adalah 12,5%. Data hasil pengukuran zona hambat untuk konsentrasi hambat minimum kemudian dilakukan analisis variasi dengan SPSS, agar mengetahui adanya pengaruh perbedaan konsentrasi ekstrak terhadap zona hambat.

Hasil analisis variasi menunjukkan bahwa perbedaan konsentrasi dari ekstrak etil asetat memberikan pengaruh beda nyata pada kemampuan penghambatan pertumbuhan bakteri uji, karena signifikansi hasil analisis variasi 0,000 lebih kecil dari $\alpha = 0,005$. Setelah diketahui terdapat beda nyata dari konsentrasi, analisis kemudian dilanjutkan dengan analisis DMRT untuk mengetahui letak bedanya antara konsentrasi.

Tabel 3. Hasil DMRT luas zona hambat (cm^2) aktivitas antibakteri variasi konsentrasi ekstrak etil asetat daun pohpohan terhadap mikrobia uji *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

Perlakuan	Luas Zona Hambat (cm^2)	
	<i>E. coli</i>	<i>S.aureus</i>
100 %	0,0491 ^{ab}	0,3721 ^d
50 %	0,0366 ^{ab}	0,2367 ^c
25 %	0,0240 ^{ab}	0,0751 ^b
12,5 %	0,0120 ^{ab}	0,0491 ^{ab}
6,25 %	0 ^a	0,0366 ^{ab}
3,125 %	0 ^a	0 ^a
1,5625 %	0 ^a	0 ^a
0,78125 %	0 ^a	0 ^a

Keterangan : Angka yang diikuti dengan huruf yang sama pada kolom dan baris yang sama menunjukkan tidak beda nyata pada tingkat kepercayaan 95%.

Tabel 4. Klasifikasi kemampuan penghambatan senyawa antimikrobia berdasarkan luas zona hambat (Pratama, 2005).

Luas Zona Hambat (cm^2)	Kemampuan Penghambatan
... > 3,14	Sangat Kuat
0,785 – 3,14	Kuat
0,196 – 0,785	Sedang
... < 0,196	Lemah

Dengan melihat Tabel 3, dapat diketahui bahwa konsentrasi hambat minimum ekstrak etil asetat daun pohpohan dengan bakteri uji *Staphylococcus aureus* terdapat pada konsentrasi 50% dengan rata-rata zona hambat 0,2367 cm^2 , sedangkan pada bakteri *Escherichia coli* baik konsentrasi 0,78125 % maupun 100 % tidak menunjukkan adanya beda nyata, hal ini dapat disebabkan oleh tidak efektifnya ekstrak terhadap bakteri Gram negatif, yang ditunjukkan pada Tabel 3, hasil yang diikuti huruf yang sama tidak menunjukkan adanya beda nyata dengan tingkat kepercayaan 95 %.

- Endrini, S. 2011. Antioxidant activity and anticarcinogenic properties of “rumput mutiara” (*Hedyotis corymbosa* (L.) Lam.) and “pohpohan” (*Pilea trinervia* (Roxb.) Wight). *J. Medicinal Plants Research* 5 (16): 3715-3718.
- Farag, R.S., Daw, Z.Y., Hewedi, F.M., dan El-Baroty, G.S.A. 1989. Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. *J. Food Protec* 52 (9) : 665-667.
- Gasperz, V. 1994. *Metode Perancangan Percobaan*. Penerbit Armico, Jakarta.
- Handayani, T., Tuasikal, B.J., dan Sugoro, I. 2006. LD₅₀ Sinar Gamma Pada *Streptococcus agalactiae* Untuk Bahan Vaksin Iradiasi Mastitis Pada Sapi Perah. *Risalah Seminar Ilmiah, Aplikasi Isotop dan Radiasi*, BATAN.
- Harborne, J.B. 1987. *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Penerbit ITB, Bandung. Halaman 5; 234.
- Hermawan, A., Hana, W., dan Wiwiwk, T. 2007. Pengaruh Ekstrak Daun Sirih (*Piper betle* L.) Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* Dengan Metode Difusi Disk. *Naskah Skripsi-S1*. Universitas Erlangga.
- Heyne, K. 1987. *Tumbuhan Berguna Indonesia*. Badan Litbang Kehutanan, Jakarta.
- Jannah, A., dan Suryadinata, A. 2012. Hidrolisis Gugus Metoksil Pektin Ampas Tebu Untuk Menghasilkan Biometanol. *J.SAINSTIS* 1 (2) :74-89.
- Johnson, T.R., dan Case, C.L. 2010. *Laboratory Experiments in Microbiology 9th edition*. Pearson Benjamin Cummings, San Francisco. Halaman. 25.
- Koirewoa, Y.A., Fatimawali, dan Weny I.W. 2012. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid Dalam Daun Beluntas (*Pluchea indica* L.). *J. Pharmacon* 1 (1): 47-52.
- Korompis, G.E.C., Danes, V.R., dan Sumampouw, O.J. 2010. Uji Invitro Aktivitas Antibakteri Dari *Lansium domesticum* Correa (Langsat). *Chem. Prog.* 3 (1): 13-19.
- Kusmiyati, dan Agustini, N.W.S. 2006. Uji Aktivitas Senyawa Antibakteri dari Mikroalga *Prophyridium cruentum*. *J. Biodiversitas* 8 (1) : 48-53.
- Kusumaningtyas, E., Widiati, R.R., dan Gholib, D. 2008. Uji Daya Hambat Ekstrak dan Krim Ekstrak Daun Sirih (*Piper betle*) Terhadap *Candida albicans* dan *Trichophyton mentagrophytes*. *Naskah Seminar Teknologi Peternakan dan Veteriner*. Halaman. 805-812.
- Lathifah, Q.A. 2008. Uji Efektifitas Ekstrak Kasar Senyawa Antibakteri Pada Buah Belimbing Wuluh (*Everrhoa bilimbi* L.) Dengan Variasi Pelarut. *Naskah Skripsi S1*. Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Malang.
- Masduki, I. 1996. Efek Antibakteri Ekstrak Biji Pinang (*Areca catechu*) terhadap *S. aureus* dan *E. coli* *in vitro*. *J. Cermin Dunia Kedokteran* 109 : 21-24.
- Mc Charty, P.J., Pitts, T.P., Geewanda, Borges, M.K., dan Pomponi, S.A. 1992. Antifungal activity of meridine, a natural product from the marine sponge *Corticum sp.* *J. Natural Production* 55 (11) : 1664-1668.
- Mulyati, E. S. 2009. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etil Asetat Daun Ciremai (*Phyllanthus acidus* L. Skell) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dan Bioautografinya. *Naskah Skripsi S1*. Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta. Surakarta.
- Owoyale, J.A., Olatunji, G.A., dan Oguntoye, S.O. 2005. Antifungal and Antibacterial Activities of an Alcoholic Extract of *Senna alata* Leaves. *J. of Applied Science and Environmental Management*. 9 (3) : 105-107.
- Perry, J.J., Staley, J.T., dan Lory, S. 2002. *Microbial life*. Sinauer Associates, Massachusetts. Halaman. 154-155.
- Peoloengan, M., Chairul, Komala, I., Salmah, S., dan Susan, M.N. 2006. Aktivitas Antimikrobia dan Fitokimia Dari Beberapa Tanaman Obat. *Naskah Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner*. Fakultas Peternakan IPB, Bogor.
- Pratama, M.R. 2005. Pengaruh Ekstrak Serbuk Kayu Siwak (*Salvadora persica*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Streptococcus mutans* dan *Staphylococcus aureus* Dengan Metode Difusi Agar. *Naskah Skripsi S-1*. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Rivai, H., Nurdin, H., Suyani, H., dan Bakhtiar, A. 2010. Pengaruh Cara Pengeringan Terhadap Perolehan Ekstraktif, Kadar Senyawa Fenolat dan Aktivitas Antioksidan Dari Jambu Biji (*Psidium guajava* Linn.). *J.Bahan Alam Indonesia* Vol. 7 (4): 175-178.
- Rompas, R.A., Hosea, J. E., dan Adithya, Y. 2012. Isolasi dan Identifikasi Flavonoid Dalam Daun Lamun (*Syringodium isoetifolium*). *J. Pharmacon* 1 (2): 59-63.

- Sangi, M., Max, R.J.R., Henry, E.I.S., dan Veronica, M.A.M. 2008. Analisis Fitokimia Tumbuhan Obat Di Kabupaten Minahasa Utara. *J. Progres in Chemistry*. 1 (1): 47-53.
- Sastrohamidjojo, H. 1996. *Sintesis Bahan Alam*. UGM Press, Yogyakarta.
- Schunack, W., Mayer, K., dan Haake, M. 1990. *Senyawa Obat Ed 2*. UGM Press, Yogyakarta.
- Shitut, S., Pandit, V., dan Metha, B.K. 1999. The antimicrobial efficiency of *Piper betle* Linn leaf (stalk) against human pathogenic bacterial and phytopathogenic fungi. *Central European Journal of Public Health* 7(3) : 137-139.
- Siemonsma, J.S., dan Piluek, K. 1994. *Plant Resources of South-East Asia; No.8 Vegetables*. Prosea Foundation, Bogor. Halaman. 224-226.
- Siregar, A.F., Sabdono, A., dan Pringgenies, D. 2012. Potensi Antibakteri Ekstrak Rumput Laut Terhadap Bakteri Penyakit Kulit *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, dan *Micrococcus luteus*. *J. of Marine Research* 1 (2) : 152-160.
- Titis, M.B.M., Fachriyah, E., dan Kusriani, D. 2013. Isolasi, Identifikasi, dan Uji Aktifitas Senyawa Alkaloid Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Tenore) Steenis). *J. of Chemical Information and Modeling* 1 (1) : 196-201.
- van Steenis, C.G.G.J. 2010. *Flora Pegunungan Jawa*. Pusat Penelitian Biologi-LIPI, Bogor.
- Waluyo, L. 2010. *Teknik dan Metode Dasar Dalam Mikrobiologi*. UMM Press, Malang.
- Wistreich, G. 1999. *Microbiology Perspectives: A Photographic Survei of The Microbial World*. Prentice Halamanl, New Jersey. Halaman. 50-52, 56-58, 75.