

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOLIK
DAGING BUAH BUNI (*Antidesma bunius* (L.) Spreng) TERHADAP
Staphylococcus aureus ATCC 25922 dan *Escherichia coli* ATCC 25923**

BRIGITTA LYNDIA RAKASIWI DAN C.J.SOEGIHARDJO

Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma Yogyakarta

Email korespondensi: *constantinus_soegihardjo@yahoo.com*

Abstract: The aim of the study was to determine the antibacterial activity of buni skin-pulp ethanolic extract against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Escherichia coli* ATCC 25922. Profile of antibiotic resistance which is growing among *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* need some exploration of antibacterial activity buni skin-pulp because the contain of anthocyanin which has antibacterial activity. The research was purely experimental research with randomized complete direct sampling design. The extraction method was done by macerated in ethanol solvent. Tube tests and Thin Layer Chromatography (TLC) were used to determine the content of the secondary metabolites substance in buni skin-pulp ethanolic extract. Antibacterial activity test was done by diffusion method, then followed with liquid dilution method to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC). The antibacterial activity was evaluated based on the result of inhibition zone diameter then analyzed with Kruskal-Wallis test followed with Mann-Whitney test. The results showed that the chemical substances of the buni skin-pulp ethanolic extract predicted with TLC assay were phenolic, flavonoids, and anthocyanin compounds. The antibacterial activity showed that the ethanolic extract only had antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 with MIC and MBC values 30% and 33%, respectively.

Keywords: antibacterial potency, buni skin-pulp, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*

1. Pendahuluan

Diare adalah gangguan saluran pencernaan berupa terjadinya likuiditas dan frekuensi buang air besar yang abnormal (lebih dari tiga kali dalam sehari) (Sukandar, dkk., 2009). Diare merupakan salah satu penyakit yang paling banyak terjadi, khususnya di negara berkembang dengan insiden dan mortalitas yang tinggi. Menurut *World Health Organization* (WHO) dan *United Nations International Children's Emergency Fund* (UNICEF), sekitar dua miliar kasus penyakit diare setiap tahun. Sebanyak satu juta sembilan ratus anak-anak berusia kurang dari 5 tahun setiap tahunnya meninggal karena diare, terutama di negara-negara berkembang. Kematian anak akibat diare ini 78% terjadi di daerah Afrika dan Asia Tenggara. Diare dapat disebabkan oleh bakteri (*Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Campylobacter jejuni*, *Shigella sp.*), virus (Rotavirus), dan parasit

(Farthing, *et al.*, 2012).

Penularan penyakit diare dapat terjadi melalui kontak langsung dan biasanya terjadi di tempat yang memiliki sanitasi dan lingkungan yang kurang bersih. Infeksi *Escherichia coli* sering kali berupa diare yang disertai darah, kejang perut, demam, dan terkadang dapat menyebabkan gangguan pada ginjal. Sebagian besar penyakit yang disebabkan oleh *Escherichia coli* ditularkan melalui makanan yang tidak masak dan daging yang terkontaminasi, sedangkan *Staphylococcus* merupakan penyebab penting dalam keracunan makanan sehingga dapat menyebabkan diare. Diare sering kali diobati dengan pemberian antibiotika. Penggunaan antibiotika yang tidak rasional bisa membuat mikroba menjadi resisten. Untuk mengatasi hal ini, perlu dilakukan pencarian senyawa antibakteri baru yang memungkinkan untuk penemuan obat baru yang dapat menggantikan senyawa

antibakteri yang sudah ada. Salah satu cara untuk menemukan senyawa antibakteri yang baru, yaitu dengan melakukan eksplorasi bahan alam hingga memodifikasi struktur antibiotik yang sudah ada.

Antosianin merupakan pigmen yang bertanggung jawab memberikan warna pada buah, sayur, bunga, dan jaringan tanaman lainnya. Beberapa penelitian terakhir, antosianin ternyata memiliki aktivitas biologi yang menguntungkan. Salah satu aktivitas biologi dari antosianin adalah antimikroba (Mazza, 2007). Jenis bahan pangan yang mengandung antosianin diantaranya adalah berbagai jenis buah *berry*. Salah satu jenis *berry* dan merupakan buah lokal adalah buni (*Antidesma bunius*). Berdasarkan penelitian Butkhup dan Samappito (2011) menunjukkan bahwa ekstrak metanol biji dan daging buah buni mengandung flavonoid (katekin, epikatekin, rutin, mirisetin, trans-resveratrol, lutein, kuersetin, naringenin, dan kaempferol), antosianin (prosianidin B1 dan prosianidin B2), dan asam fenolat (asam galat, asam kafeat, asam elagat, dan asam ferulat). Oleh karena itu, sangat dimungkinkan dilakukan eksplorasi senyawa antibakteri baru dari buah buni. Eksplorasi tanaman ini diharapkan dapat dijadikan bentuk sediaan antimikroba, sehingga perlu diketahui Konsentrasi Hambat Minimal (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM). Konsentrasi yang diperoleh dapat digunakan sebagai konsentrasi dasar dalam pengujian secara *in vivo*.

Sehubungan dengan potensi yang dimiliki daging buah buni dan dalam usaha mendapatkan bukti secara ilmiah tentang khasiat daging buah buni terutama sebagai obat diare yang disebabkan oleh bakteri, maka penelitian ini dilakukan untuk mengetahui senyawa-senyawa yang terkandung di dalam ekstrak etanolik daging buah buni dan membuktikan aktivitas antibakteri ekstrak etanol daging buah buni terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922.

Permasalahan yang bisa diambil dari penelitian ini yaitu: Golongan senyawa

apa saja yang terdapat dalam ekstrak etanolik daging buah buni?, Apakah ekstrak etanolik daging buah buni mempunyai potensi antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922?, Berapa KHM dan KBM dari ekstrak etanol daging buah buni terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922?

2. Bahan dan Metode Penelitian

Bahan Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang diperoleh dari Balai Laboratorium Kesehatan Yogyakarta, *Escherichia coli* ATCC 25922 yang diperoleh dari Balai Besar Teknik Kesehatan Lingkungan dan Pengendalian Penyakit Yogyakarta. Sampel berupa daging buah buni didapat di dari tanaman yang tumbuh di Taman Universitas Sanata Dharma, Kampus III, Paingan, Maguwoharjo, Yogyakarta. Pelarut yang digunakan yaitu: Etanol 96% farmasetis sebagai pelarut ekstrak yang diperoleh dari PT Brataco Yogyakarta. *Aquadest* diperoleh dari Laboratorium Farmakognosi-Fitokimia Universitas Sanata Dharma Yogyakarta dan *aquabidestilata* steril yang diperoleh dari *Lucas Pharmaceutichal Industry*. Bahan pelarut ekstrak dan kontrol negatif adalah sebagai kontrol negatif adalah dimetilsulfoksida p.a (*Merck*) yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Universitas Gadjah Mada. Bahan uji tabung adalah Bouchardat LP, Dragendroff LP, Mayer LP, besi (III) klorida LP, serbuk zink P dan serbuk magnesium P, natrium hidroksida LP, Liebermann-Burchard LP, asam klorida p.a, asam sulfat p.a, etanol p.a (*Merck*) yang diperoleh dari Laboratorium Farmakognosi-Fitokimia Universitas Sanata Dharma Yogyakarta. Bahan uji antibakteri adalah timol p.a sebagai kontrol positif yang diperoleh dari Laboratorium Biologi Farmasi Universitas Gadjah Mada. Fase diam yang digunakan dalam uji KLT adalah silika gel GF₂₅₄ dan selulosa (*Merck*) yang diperoleh dari Laboratorium Farmakognosi-Fitokimia Universitas Sanata Dharma Yogyakarta. Fase

gerak yang digunakan dalam uji KLT adalah etil asetat p.a, asam format p.a, asam asetat glasial p.a, toluena p.a, dan n-butanol p.a (*Merck*) yang diperoleh dari diperoleh dari Laboratorium Farmakognosi-Fitokimia Universitas Sanata Dharma Yogyakarta. Bahan media pertumbuhan bakteri adalah Muller Hinton Broth CM0405, Nutrien Broth No. 2 CM0067 (*Oxoid*), dan Agar (*Merck*) yang diperoleh dari Balai Besar Teknik Kesehatan Lingkungan dan Pengendalian Penyakit Yogyakarta.

Alat yang digunakan dalam penelitian berupa Alat-alat gelas, autoklaf (TOMY SX-500), inkubator (Binder), *oven* (Memmert), *rotary evaporator* (Buchi), jarum ose, timbangan analitik dengan kepekaan 0,1 mg (Mettler Toledo), timbangan elektrik (Denver), jangka sorong dengan ketelitian 0,02 mm (Oscano), *ball pipet*, mikropipet (*Socorex Acura 825*) dan mikropipet P200 (Gilson 0503356), *bunsen*, *show case* (Modena), cawan petri (*Pyrex*), Class II *Biological Safety Cabinet* (ESCO), *vortex* (Maxi Mix II), PhoenixSpec Nephelometer, pompa vakum (EZ-STREAM™) dan Millipore®, serta seperangkat alat-alat KLT.

3. Tata Cara Penelitian

3.1 Pengambilan bahan buah buni

Buah buni diperoleh dari Taman Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta. Cara pemanenan buah buni yang digunakan pada penelitian ini, yaitu diambil buah yang berwarna hitam berbentuk bulat telur dan buah tidak jatuh ke tanah. Pemanenan buah buni dilakukan bulan Maret 2013 pada pagi hari sebelum pukul 10.00 WIB.

3.2 Determinasi tanaman buah buni

Determinasi dilakukan di Laboratorium Kebun Tanaman Obat, Fakultas Farmasi, Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta. Proses determinasi dilakukan dengan menggunakan bagian tanaman buni seperti daun, buah, dan bunga.

3.3 Penyarian daging buah buni

Sebanyak 300 g buah buni direndam dengan etanol 96% setinggi kurang lebih dua sentimeter dari tinggi buah buni dan didiamkan dalam tempat gelap selama enam

hari dan setiap enam jam sekali diaduk, kemudian disaring. Hasil maserasi (maserat) disimpan di dalam almari es. Remaserasi selama enam hari sambil setiap 6 jam sekali diaduk, kemudian disaring. Setelah itu, kedua maserat didiamkan selama 24 jam, disaring, dan diuapkan menggunakan *rotary evaporator*.

3.4. Skrining fitokimia

Skrining fitokimia meliputi uji tabung dan uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT).

3.4.1. Uji tabung

Uji tabung ekstrak etanol daging buah buni meliputi uji alkaloid, uji tanin, uji flavonoid, uji antosianin, uji saponin, dan uji triterpenoid.

Uji alkaloid. Sebanyak 2 g ekstrak dan 2 g serbuk daun kecubung masing-masing ditambahkan satu milliliter asam klorida 2N dan sembilan milliliter *aquadest*. Dipanaskan di penangas air selama 2 menit, didinginkan dan disaring. Dipindahkan ke tiga tabung reaksi masing-masing sebanyak 3 mL dan masing-masing ditetesi pereaksi Dragendorff, Mayer, dan Bouchardat. Kedua hasil yang diperoleh dibandingkan (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995).

Uji tanin. Sebanyak 3 mL larutan sampel dan larutan tanin masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditambahkan lima tetes pereaksi besi (III) klorida. Kedua hasil yang diperoleh dibandingkan (Hayati dan Halimah, 2010).

Uji flavonoid. Sebanyak 3 mL larutan sampel dan larutan rutin masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan sedikit logam zink atau logam magnesium, serta diberi lima tetes asam klorida 5N. Hasil yang diperoleh dibandingkan (Krishnan, 2009).

Uji antosianin. Sebanyak 3 mL larutan sampel dan sebagai standar digunakan larutan ekstrak metanolik daging buah anggur merah masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Tambahkan natrium hidroksida dan asam sulfat masing-masing 3 mL. Hasil yang diperoleh dibandingkan dengan standar (Krishnan, 2009).

Uji saponin. Sebanyak 5 mL larutan sampel

dikocok kuat selama 10 detik. Tabung dikondisikan berdiri tegak dan diamati yang terjadi dan dibandingkan dengan standar daging buah lerak yang diperlakukan sama (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995).

Uji triterpenoid. Sebanyak 3 mL larutan sampel dan pembanding *Succus liquiritiae* direaksikan dengan lima tetes Liebermann-Burchard (LP). Diamati cincin yang terbentuk pada perbatasan kedua larutan (Hayati dan Halimah, 2010).

3.4.2. Uji KLT

Uji KLT flavonoid. Fase diam yang digunakan, yaitu silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak yang digunakan adalah etil asetat-asam format- asam asetat glacial- air dengan perbandingan 100:11:11:27 (v/v). Standar pembanding yang digunakan adalah rutin. Hasil dideteksi dengan UV 254 nm, UV 365 nm, dan pereaksi semprot sitroborat (Wagner & Bladt, 2009).

Uji KLT tanin. Uji KLT tanin menggunakan fase diam, yaitu silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak yang digunakan adalah etil asetat-

asam format- toluena- air dengan perbandingan 6:1,5:3:0,5 (v/v.). Sebagai pembanding digunakan asam galat. Hasil dideteksi di bawah sinar UV 254 nm, UV 365 nm, dan pereaksi semprot besi (III) klorida (Wagner & Bladt, 2009).

Uji KLT antosianin. Uji KLT antosianin menggunakan fase diam selulosa dan fase gerak yang digunakan, yaitu n-butanol - asam asetat glacial - air dengan perbandingan 4:1:5 (v/v), fase atas. Sebagai pembanding digunakan ekstrak metanolik daging buah anggur merah. Hasil dideteksi pada sinar tampak (Harborne, 1987).

3.5. Uji potensi antibakteri ekstrak etanol daging buah buni terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922

Pembuatan orientasi konsentrasi larutan uji. Larutan uji yang digunakan untuk orientasi uji aktivitas antibakteri ekstrak etanolik daging buah buni dibuat dalam konsentrasi 40%, 60%, dan 80%.

Pembuatan variasi konsentrasi larutan uji. Larutan uji yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri merupakan ekstrak

Tabel I. Hasil Pengamatan Uji Tabung Terhadap Ekstrak Etanolik Daging Buah Buni

No	Uji Tabung	Pereaksi	Hasil		Keterangan	
			Standar	Sampel	Standar	Sampel
1	Uji Alkaloid	Bourchadat	+	-	Endapan coklat	Tidak ada endapan
		Dragendroff	+	-	Endapan coklat	Tidak ada endapan
		Mayer	+	-	Endapan putih	Tidak ada endapan
2	Uji Tanin	FeCl ₃	+	+	Coklat	Biru tua
3	Uji Flavonoid	Mg	+	+	Merah	Merah
		Zn	-	+	Oranye	Merah muda
4	Uji Antosianin	NaOH	+	+	Biru tua	Biru tua
		H ₂ SO ₄	+	+	Merah	Merah
5	Uji Saponin	<i>Aquadest</i>	+	-	Terbentuk buih setinggi 6,9 cm	Terbentuk buih setinggi 1,2 cm
6	Uji Triterpenoid	Liebermann-Burchard	+	+	Terbentuk cincin ungu	Terbentuk cincin coklat ungu

etanolik yang dibuat dalam berbagai konsentrasi, yaitu 40,5%; 27%; 18%; 12%; dan 8%.

Metode difusi. Pengujian potensi antibakteri ekstrak etanolik daging buah buni dilakukan dengan metode difusi sumuran *bi-layer*. Lapisan I merupakan media agar 1,5% dan lapisan II merupakan media Mueller Hinton Agar (MHA) yang sudah bercampur dengan suspensi bakteri uji. Media padat yang telah berisi bakteri dibuat sumuran berdiameter 5 mm dan ditetesi dengan seri konsentrasi senyawa uji sebanyak 50 µl. Kontrol positif digunakan timol dan kontrol negatif digunakan DMSO 1,1%. Diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

Metode dilusi cair. Metode dilusi cair digunakan blanko berupa 4 mL MHB steril ditambah 1 mL dari masing-masing konsentrasi ekstrak etanolik daging buah buni yang digunakan. Kelompok perlakuan dilakukan dengan cara, 4 mL media MHB steril ditambahkan 1 mL suspensi bakteri uji yang telah disetarakan dengan standar Mc Farland II dan 1 mL ekstrak etanolik daging buah buni dengan kadar tertentu, sesuai dengan hasil pada uji difusi padat. Pengamatan dilakukan pada jam ke-0, 24, dan 48 jam dengan suhu inkubasi 37°C (Mohamedkassm, *et al.*, 2013). Uji penegasan dilakukan dengan cara melakukan *streak plate* pada media agar darah domba dan diinkubasi selama 24 serta 48 jam.

4. Hasil dan Pembahasan

4.1. Hasil determinasi

Identifikasi tanaman ini bertujuan untuk memastikan bahwa tanaman yang

digunakan adalah tanaman buni. Hasil determinasi menunjukkan bahwa buah buni yang digunakan memiliki nama ilmiah *Antidesma bunius* (L.) Spreng.

4.2. Pembuatan ekstrak etanolik daging buah buni

Prinsip dari maserasi, yaitu cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif sehingga zat aktif dapat terlarut. Setelah maserasi pertama selama enam hari maka dilakukan remaserasi agar didapatkan maserat yang lebih optimal. Remaserasi dilakukan juga selama enam hari. Hal ini dilandasi pada penelitian Drahici dan Rapeanu (2011) yang menunjukkan bahwa semakin lama maserasi anggur dilakukan, maka akan meningkatkan kandungan polifenolnya. Hasil rendemen yang diperoleh sebesar 11,3 % b/b.

4.3. Hasil Skrining Fitokimia

Tujuan utama skrining fitokimia adalah untuk mengidentifikasi kandungan bioaktif atau kandungan yang mempunyai aktivitas dalam pengobatan sebagai antibakteri.

4.3.1. Uji tabung

Hasil uji tabung ekstrak etanol daging buah buni yang diperoleh dibandingkan dengan standar yang digunakan. Hasil dikatakan positif jika terdapat persamaan atau kemiripan warna dengan standar.

Berdasarkan hasil penelitian ini, diduga bahwa di dalam ekstrak etanolik daging buah buni mengandung senyawa flavonoid, tanin, antosianin dan triterpenoid

Tabel II. Diameter Zona Hambat yang Dihasilkan Pada Orientasi Kontrol Positif Timol

Senyawa Uji	Diameter Zona Hambat <i>S. aureus</i> (mm ± SD) (n=3)	Diameter Zona Hambat <i>E. coli</i> (mm ± SD) (n=3)
Timol 0,2%	14,333 ± 0,577	12,333 ± 2,082
Timol 0,4%	5 ± 0,00	5 ± 0,00
Timol 0,8%	5 ± 0,00	5 ± 0,00
Timol 1%	5 ± 0,00	5 ± 0,00

Keterangan: Diameter sumuran 5 mm

Tabel III. Diameter Zona Hambat yang Dihasilkan pada Orientasi Konsentrasi Ekstrak Etanol Daging Buah Buni

Senyawa Uji	Diameter Zona Hambat <i>S. aureus</i> (mm ± SD) (n=3)	Diameter Zona Hambat <i>E. coli</i> (mm ± SD) (n=3)
Ekstrak Etanolik Daging Buah Buni 40%	21,667 ± 1,528	5 ± 0,00
Ekstrak Etanolik Daging Buah Buni 60%	32,667 ± 3,055	5 ± 0,00
Ekstrak Etanolik Daging Buah Buni 80%	39,667 ± 1,528	5 ± 0,00

sesuai dengan Tabel I. Untuk mempertegas hasil uji tabung maka dapat dilanjutkan dengan analisis semi kuantitatif secara KLT.

4.3.2. Uji Kromatografi Lapis Tipis

Sistem KLT yang digunakan dalam penelitian ini adalah fase normal (uji KLT flavonoid dan tanin) dan fase terbalik (uji KLT antosianin). Interaksi yang terjadi antara analit dengan fase diam adalah adsorpsi. Analit yang berinteraksi dengan fase diam akan terpartisi kemudian terelusi oleh fase gerak. Nilai R_f yang baik berkisar 0,09 – 0,9 (Srivastava, 2011).

Berdasarkan hasil uji kromatografi lapis tipis diketahui bahwa ekstrak etanol daging buah buni mengandung senyawa flavonoid dan antosianin. Hal ini karena adanya kemiripan warna dan nilai R_f antara standar dan sampel.

4.4. Hasil Orientasi Kontrol Positif Timol dan Ekstrak Etanolik Daging Buah Buni terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan Metode Difusi Padat dan Dilusi Cair

Pada penelitian ini dilakukan orientasi untuk menentukan konsentrasi awal yang dapat memberikan zona penghambatan pada bakteri uji. Orientasi dilakukan pada kontrol positif timol, kontrol negatif DMSO 1,1 % dan ekstrak etanolik daging buah buni.

4.4.1. Penetapan konsentrasi kontrol positif

Kontrol positif timol dipilih karena timol merupakan senyawa antibakteri yang

berasal dari tanaman *Thymus vulgaris* yang memiliki mekanisme kerja merusak membran sel bakteri, sehingga bakteri kehilangan struktur yang kaku dan terjadi kebocoran bahan-bahan intrasel. Kontrol positif ini memiliki kemiripan dengan antosianin dalam mekanisme aksi dalam membunuh bakteri. Antosianin dapat memberikan efek antibakteri dengan mekanisme merusak permeabilitas dinding sel, sehingga terjadi kebocoran bahan-bahan intraseluler dan bakteri mati. Kontrol positif timol diuji dengan variasi konsentrasi, yaitu 0,2%; 0,4%; 0,8%, dan 1%.

Pada umumnya, diameter zona hambat cenderung meningkat sebanding dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa hanya timol 0,2% memberikan zona hambat pada *S. aureus* dan *E. coli*. Tidak terbentuknya zona hambat pada konsentrasi 0,4%; 0,8%; dan 1% diduga disebabkan perbedaan kecepatan difusi senyawa antibakteri pada media agar. Oleh karena itu, timol 0,2% akan dilanjutkan pengujiannya dengan metode dilusi cair. Menurut Nurmahani, *et al.* (2012), KHM didefinisikan sebagai konsentrasi terendah ekstrak yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri dalam waktu 24 jam inkubasi. KBM merupakan konsentrasi dari sebuah senyawa antibakteri untuk membunuh bakteri dalam waktu 48 jam inkubasi. Setelah dilakukan uji penengasan, pada timol 0,2% menunjukkan bahwa tidak ada pertumbuhan bakteri didaerah sekitar *streak plate* dengan lama inkubasi 24 jam dan

48 jam. Oleh karena itu, pada konsentrasi timol 0,2% dijadikan konsentrasi uji pada pengujian antibakteri dengan metode difusi padat.

4.4.2. Penetapan variasi konsentrasi ekstrak etanolik daging buah buni

Pada orientasi konsentrasi ekstrak etanolik daging buah buni, yaitu 40%, 60%, dan 80%. Selain variasi ekstrak, dilakukan juga pengujian terhadap kontrol negatif DMSO 1,1%. Kontrol negatif berfungsi untuk mengetahui apakah pelarut yang digunakan memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan *S. aureus* dan *E. coli* atau tidak. Pelarut yang memiliki kemampuan untuk menghambat bakteri uji dapat membiaskan hasil penelitian.

Pada Tabel III diketahui bahwa ekstrak etanol daging buah buni 40%; 60%; dan 80% memberikan zona hambat pada bakteri *S. aureus* dengan lama inkubasi 24 jam, sedangkan pada bakteri *E. coli* tidak menunjukkan zona hambat. Setelah diuji secara statistik ekstrak etanol daging buah buni pada konsentrasi 40%, 60%, dan 80% memiliki daya antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*. Hal ini terbukti dengan adanya nilai diameter zona hambat yang lebih besar dengan perbedaan bermakna dari kontrol negatif. Dari data

tersebut, maka ekstrak etanolik daging buah buni 40% akan dijadikan sebagai konsentrasi dasar pada pengujian antibakteri dengan metode difusi sumuran.

4.5. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daging Buah Buni terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan Metode Difusi Padat

Variasi konsentrasi ekstrak etanol daging buah buni yang digunakan, yaitu 40,5%; 27%; 18%; 12%; dan 8%. Berikut ini merupakan hasil pengamatan diameter zona hambat yang diperoleh.

Berdasarkan Tabel IV, zona hambat yang terbentuk dari ekstrak etanol daging buah buni hanya mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji *S. aureus*. Tidak adanya zona hambat yang diberikan pada bakteri *E. coli* dapat disebabkan karena senyawa antibakteri tidak dapat merusak membran sitoplasma *E. coli*. Hal ini karena *outer membran E. coli* bersifat lipofilik karena mengandung lipopolisakarida. Senyawa-senyawa yang dapat ditarik oleh etanol merupakan senyawa yang bersifat semipolar, sehingga sukar berdifusi pada membran yang lipofilik. Berdasarkan perhitungan statistik, ekstrak etanolik daging

Tabel IV. Diameter Zona Hambat yang Dihasilkan pada Beberapa Konsentrasi Ekstrak Etanolik Daging Buah Buni

Senyawa Uji	Diameter Zona Hambat <i>S. aureus</i> (mm ± SD) (n = 3)	Diameter Zona Hambat <i>E. coli</i> (mm ± SD) (n=3)
Kontrol Positif (Timol 0,2%)	20,667 ± 2,082	14,767 ± 0,577
Kontrol Negatif (DMSO 1,1%)	5 ± 0,000	5 ± 0,000
Ekstrak Etanolik Daging Buah Buni 8%	5 ± 0,000	5 ± 0,000
Ekstrak Etanolik Daging Buah Buni 12%	5 ± 0,000	5 ± 0,000
Ekstrak Etanolik Daging Buah Buni 18%	8,667 ± 0,577	5 ± 0,000
Ekstrak Etanolik Daging Buah Buni 27%	14,333 ± 0,577	5 ± 0,000
Ekstrak Etanolik Daging Buah Buni 40,5%	19 ± 1,732	5 ± 0,000

Keterangan: Diameter sumuran 5 mm

Tabel V. Hasil Uji Daya Antibakteri Ekstrak Etanol Daging Buni terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 Menggunakan Metode Dilusi Cair

Kelompok	Nilai Kekeruhan Media Blanko jam ke- (Mc Farland $\pm$ SD) (n=3)			Nilai Kekeruhan Media Perlakuan jam ke- (Mc Farland $\pm$ SD) (n=3)		
	0	24	48	0	24	48
Kontrol media	0,070 $\pm$ 0,000	0,057 $\pm$ 0,012	0,050 $\pm$ 0,000	-	-	-
Kontrol pertumbuhan bakteri	-	-	-	0,203 $\pm$ 0,006	2,887 $\pm$ 0,081	1,913 $\pm$ 0,115
Ekstrak etanolik daging buah buni 15%	0,110 $\pm$ 0,008	0,093 $\pm$ 0,005	0,067 $\pm$ 0,012	0,190 $\pm$ 0,020	0,920 $\pm$ 0,053	0,820 $\pm$ 0,079
Ekstrak etanolik daging buah buni 18%	0,103 $\pm$ 0,009	0,087 $\pm$ 0,021	0,077 $\pm$ 0,012	0,210 $\pm$ 0,000	0,713 $\pm$ 0,076	0,317 $\pm$ 0,051
Ekstrak etanolik daging buah buni 21%	0,140 $\pm$ 0,008	0,097 $\pm$ 0,017	0,080 $\pm$ 0,014	0,247 $\pm$ 0,021	0,613 $\pm$ 0,040	0,330 $\pm$ 0,036
Ekstrak etanolik daging buah buni 24%	0,143 $\pm$ 0,009	0,103 $\pm$ 0,012	0,053 $\pm$ 0,009	0,220 $\pm$ 0,010	0,707 $\pm$ 0,060	0,237 $\pm$ 0,012
Ekstrak etanolik daging buah buni 27%	0,147 $\pm$ 0,012	0,113 $\pm$ 0,009	0,087 $\pm$ 0,005	0,283 $\pm$ 0,046	0,267 $\pm$ 0,029	0,197 $\pm$ 0,025
Ekstrak etanolik daging buah buni 30%	0,250 $\pm$ 0,016	0,160 $\pm$ 0,024	0,113 $\pm$ 0,026	0,380 $\pm$ 0,035	0,297 $\pm$ 0,067	0,193 $\pm$ 0,075
Ekstrak etanolik daging buah buni 33%	0,237 $\pm$ 0,017	0,183 $\pm$ 0,024	0,127 $\pm$ 0,034	0,373 $\pm$ 0,006	0,260 $\pm$ 0,052	0,177 $\pm$ 0,071

Keterangan: - = Tidak ada pengujian

buah buni pada konsentrasi 40,5; 27%; dan 18% memiliki daya antibakteri terhadap *S. aureus*. Hal ini terbukti dengan adanya nilai diameter zona hambat yang lebih besar dengan perbedaan bermakna dari kontrol negatif. Jika dibandingkan dengan kontrol positif (timol 0,2%), ekstrak etanol daging buah buni tidak memiliki daya antibakteri sekuat timol 0,2%. Dari data tersebut, maka ekstrak etanol daging buah buni 40,5%; 27%, dan 18% akan digunakan dalam dilusi cair.

4.6. Penentuan Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimum (KBM) Ekstrak Etanol Daging Buah Buni terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dengan Metode Dilusi Cair

Prinsip metode dilusi adalah senyawa antimikroba diencerkan sehingga diperoleh

beberapa konsentrasi. Oleh karena itu, ekstrak etanolik daging buah buni 18% dibuat seri konsentrasi. Seri konsentrasi yang digunakan, yaitu 15%, 18%, 21%, 24%, 27%, 30%, dan 33%.

Pada Tabel V terlihat bahwa terdapat penurunan kekeruhan media pada kelompok ekstrak etanolik daging buah buni dengan lama inkubasi 48 jam jika dibandingkan dengan inkubasi 24 jam. Hasil ini dapat diartikan bahwa ekstrak etanol daging buah buni dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri uji.

Uji penegasan dilakukan pada ekstrak etanolik daging buah buni 24%, 27%, 30%, dan 33% dengan lama inkubasi 24 jam dan 48 jam. Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa nilai KHM pada konsentrasi 30% dan nilai KBM pada konsentrasi 33%.

5. Kesimpulan dan Saran

Berdasarkan uji tabung yang dilakukan, ekstrak etanolik daging buah buni diduga mengandung senyawa flavonoid, polifenol, antosianin, dan triterpenoid. Uji KLT menunjukkan ada profil bercak yang mirip dengan profil bercak flavonoid dan antosianin. Ekstrak etanol daging buah buni hanya memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Nilai Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ekstrak etanolik daging buah buni terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 berurutan, yaitu 30% dan 33%.

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai kandungan kimia dari buah buni secara kuantitatif sehingga dapat diketahui berapa kadar senyawa flavonoid, antosianin, dan polifenol yang terkandung di dalam buah buni. Perlu diteliti pula potensi antimikroba dari batang, daun, atau bagian lainnya dari tanaman buni.

Daftar Pustaka

- Butkhup, L., dan Samappito, S., 2011, Phenolic Constituents of Extract from Mao Luang Seeds and Skin-Pulp Residue and Its Antiradical and Antimicrobial Capacities, *Journal of Food Biochemistry*, **35**, 1671-1679.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995, *Materia Medika Indonesia*, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta, Jilid V, 333-337.
- Drahici, L., dan Rapeanu, G., 2011, Evolution of Polyphenols During The Maceration of The Red Grapes, *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, **17** (2), 169–172.
- Farthing, M., Salam, M., Lindberg, G., Dite, P., Khalif, I., Lindo, E. S., Ramakrishna, B. S., Goh, K., Thomson, A., Khan, A. G., Krabshuis, J., dan Lemair, A., 2012, Acute Diarrhea in Adults and Children: A Global Perspective, *World Gastroenterology Organisation Global Guidelines*, 1-20.
- Harborne, J. B., 1987, *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*, edisi II, Penerbit ITB, Bandung, 76-78.
- Hayati, E. K., dan Halimah, N., 2010, Phytochemical Test and Brine Shrimp Lethality Test Against *Artemia salina* Leach of Anting-Anting (*Acalypha indica* Linn.) Plant Extract, *Alchemy*, **1** (2), 75-82.
- Krishnan, A., 2009, Phytopharmacological Study on *Antidesma acidum* Retz. – A Folk Plant, *Dissertation*, Rajiv Gandhi University of Health Sciences.
- Mazza, G. J., 2007, Anthocyanins and Heart Health, *Pacific Agri-Food Research Centre*, **43** (4), 369-374.
- Mohamedkassm, N., Fessehay, N., Mebrahtu, D., Teaghes, K., Fessehay, Y., Kaushik, A., dan Medhanie, G., 2013, The Etno-botanic Significance and Antimicrobial Activities of Two Plant Extracts used in Eritrea, *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*, **1** (7), 520-529.
- Nurmahani, M. M., Osm, A., Hamid, A. A., Ghazali, F. M., dan Dek, P., 2012, Short Communication Antibacterial Property of *Hylocereus* and *Hylocereus undatus* Peel Extracts, *International Food Research Journal*, **19** (1), 77-84.
- Rota, M. C., Herrera, A., Martinez, R. M., Sotomayor, J. A., dan Jordan, M. J., 2008, Antimicrobial Activity and Chemical Composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* Essential Oils, *Food Control*, **19** (2008), 681-687.
- Srivastava, M., 2011, *High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC)*, Springer Heidelberg Dordrecht, London, 290.
- Wagner, H., dan Bladt, S., 2009, *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*, 2nd edition, Springer Dordrecht Heidelberg, New York, 330.