

Antibacterial Activity of Metanol Extract and n-Butanol Fraction of *Euphorbia milii* Leaves Against *Staphylococcus aureus*

Dia Ul Aulia^{1*}, Agriana Rosmalina Hidayati¹, Dewi Suryani²

¹Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Mataram, Mataram, Nusa Tenggara Barat, Indonesia;

²Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Mataram, Mataram, Nusa Tenggara Barat, Indonesia;

Article History

Received : October 02th, 2023

Revised : October 24th, 2023

Accepted : November 24th, 2023

*Corresponding Author:

Dia Ul Aulia, Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Mataram, Mataram, Nusa Tenggara Barat, Indonesia;
Email: aulia.gil02@gmail.com

Abstract: *Euphorbia milii* is a common garden plant and its leaves have antibacterial activity, due to the presence of saponins, flavonoids, and tannins. As there is an increasing antibiotic resistance to *Staphylococcus aureus*, there is potential for *E. milii* as a new antibacterial candidate. The purpose of this study was to determine secondary metabolites of saponins, flavonoids, tannins and to determine the antibacterial activity of *E. milii* leaves in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* (in vitro). Simplisia was extracted by sonication method, then fractionated with a separatory funnel. Extracts and fractions were analyzed qualitatively by tube test and thin layer chromatography (TLC). The antibacterial activity of methanol extract (320; 160; and 80 mg/ml) and n-butanol fraction (32; 16; and 8 mg/ml) was tested by disc diffusion method. The results of qualitative test showed that the extracts and fractions were positive for saponins, flavonoids, and tannins. In antibacterial test, extract at a concentration of 320 mg/ml was able to inhibit bacterial growth with moderate activity category (6.5 mm). Extracts at 160 mg/ml and 80 mg/ml, as well as n-butanol fractions at all concentration showed weak antibacterial activity (<5 mm). This result suggests that the extracts and fractions positively contain metabolites of saponins, flavonoids, and tannins. The extracts and fractions were able to inhibit the growth of *staphylococcus aureus*, but the activity was not greater than the positive control.

Keywords: Antibacterial, disk diffusion, *Euphorbia milii*, *Staphylococcus aureus*.

Pendahuluan

Kaktus Pakis Giwang (*Euphorbia milii*) atau mahkota duri merupakan tanaman yang biasa ditemui di pekarangan rumah. Pakis giwang diketahui memiliki berbagai potensi salah satunya sebagai antibakteri. Beberapa penelitian menunjukkan *Euphorbia milii* dapat menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. Ekstrak etanol dari daun *uphorbia milii* dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) secara *in vitro* (Putra, 2012). Penelitian lain menyatakan adanya aktivitas antibakteri ini dihasilkan oleh senyawa golongan saponin

(Pratiwi, 2016). Mekanisme kerja saponin sebagai antibakteri yaitu dapat menyebabkan kebocoran protein dan enzim dari dalam sel (Sapti, 2020). Selain saponin, terdapat senyawa yang dapat menghasilkan efek antibakteri seperti flavonoid dan tanin.

Staphylococcus aureus adalah bakteri komensal sekaligus patogen pada manusia. Sekitar 30% dari populasi manusia dikolonisasi oleh *S. aureus* (Wertheim *et al.*, 2005). *S. aureus* merupakan patogen kedua yang menyebabkan kematian karena resistensi dengan kasus kematian lebih dari 250 000 pada tahun 2019 secara global. Berdasarkan data mentah dan estimasi untuk *S. aureus* yang resisten

metisilin, resistensi umumnya paling tinggi (60%-80%) di Timur Tengah dan Afrika Utara, dan sekitar 30%-40% di Asia Tenggara (Antimicrobial Resistance Collaborators, 2022).

Resistensi antibiotik terhadap *S. aureus*, salah satunya ditunjukkan pada penelitian Kayili dan Sanlibaba (2020) di Turki, mencatat sebagian besar (60-84,71%) dari isolat *S. aureus* resisten terhadap penisilin, ampisilin, dan oksasilin. Resistensi serta infeksi yang terjadi mendasari pencarian obat baru yang berasal dari tanaman, berdasarkan uraian diatas tanaman kaktus pakis giwang dapat menjadi kandidat antibakteri baru. Untuk dapat memanfaatkan kaktus pakis giwang sebagai antibakteri, perlu dilakukan proses pemisahan metabolit sekunder yang meliputi ekstraksi dan fraksinasi. Ekstrak dan fraksi selanjutnya perlu diidentifikasi kandungan metabolitnya dan diujikan aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*.

Bahan dan Metode

Alat dan bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian diantaranya gelas, pipet volume, pipet tetes, rak tabung reaksi, tabung reaksi, timbangan analitik (Kern), hot plate, cawan petri, bunsen spiritus, inkubator (Labnet), autoklaf (Tomy), batang pengaduk, ose, pinset, rotary evaporator (Heidolph), bio safety cabinet (Jisico), jangka sorong, bejana KLT, pipa kapiler, sonikator (Elmasonic S 300/h), corong pisah, kertas saring, alumunium foil, kapas, dan kertas cakram.

Penelitian menggunakan bahan antara lain daun kaktus pakis giwang (*Euphorbia milii*), metanol (CH₃OH), n-butanol (C₄H₉OH), pereaksi *Liebermann-Burchard*, bakteri *Staphylococcus aureus*, *Aluminium chloride* (AlCl₃) 10%, *Ferric chloride* (FeCl₃) 5%, *Hydrogen chloride* (HCl) 2N, aquades (H₂O), Kloramfenikol, *Dimethyl sulfoxide* (DMSO) 10%, medium *Nutrient Agar* (NA), larutan *Mc Farland* skala 0,5, larutan *Sodium chloride* (NaCl) 0,9%, dan silika gel 60 F₂₅₄.

Pembuatan simplisia daun *Euphorbia milii*

Mencuci daun pakis giwang (*Euphorbia milii*) yang telah dikumpulkan menggunakan air mengalir hingga bersih, dirajang dan

mengeringkan tanpa terkena sinar matahari secara langsung (ditutupi kain hitam) selama beberapa hari (Handoyo, 2020).

Ekstraksi sonikasi

Metode ekstraksi sonikasi dilakukan dengan mencampurkan simplisia daun pakis giwang (*Euphorbia milii*) sebanyak 100 g dengan solvent metanol 500 mL (1:5) pada erlenmeyer lalu diekstraksi pada alat sonikator selama 3 x 30 menit. Selama proses ekstraksi, digunakan alumunium foil untuk menutup bagian atas erlenmeyer untuk mencegah penguapan pelarut. Menguapkan ekstrak yang terkumpulan menggunakan rotary evaporator dengan suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak kental atau pekat.

Fraksinasi

Ekstrak pekat dilarutkan dengan 8 ml akuades dan dimasukkan dalam corong pisah 250 ml. Kemudian ditambahkan etil asetat (1:1). Setelah terpisah, menambahkan pelarut n-butanol (1:1) pada residu air. Kemudian, mengocok dan dibiarkan sampai terbentuk dua lapisan. Setelah terpisah, mengambil lapisan n-butanol dan dipekatkan dengan rotary evaporator.

Skrining Fitokimia

Saponin

Menambahkan air hangat pada ekstrak dan fraksi kental daun pakis giwang masing-masing sebanyak 1 g. Kemudian, mengocok secara vertikal selama 10 detik dan dibiarkan selama 10 detik. Ekstrak yang mengandung saponin akan membentuk busa setinggi 1-10 cm stabil kurang lebih 10 menit. HCl 2 N ditambahkan sebanyak 1 tetes, dan busa tidak hilang (Depkes RI, 1995).

Flavonoid

Menambahkan air panas secukupnya pada ekstrak dan fraksi kental sebanyak 2 mL, kemudian dididihkan selama 5 menit lalu disaring. Menambahkan 0,05 mg serbuk Mg dan 1 mL HCl pekat pada filtrat sebanyak 5 mL, selanjutnya dikocok dengan kuat. Ekstrak yang mengandung flavonoid akan membentuk warna kuning, merah, atau jingga (Harborne, 1987).

Tanin

Menambahkan tetes larutan besi (III) klorid 10% pada ekstrak dan fraksi kental sebanyak 1 mL. Sampel yang mengandung tanin akan membentuk warna hitam kehijauan atau biru tua (Jones & Kinghorn, 2006).

Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Menyiapkan lempeng alumunium silica gel GF254 ukuran panjang 10 cm dan lebar 5 cm. Melarutkan ekstrak kental dan fraksi kental menggunakan metanol ditotolkan kelempeng tepi bawah. Kemudian, memasukkan ke chamber yang berisi eluen masing- masing fase gerak golongan senyawanya.

Saponin

Fase gerak dibuat dari campuran kloroform: metanol: air (13:7:2). Lampu UV 254 dan 366 nm digunakan untuk mengamati noda. Menyemprotkan pereaksi LB ke lempeng dan memanaskan dengan suhu 110°C selama 10 menit agar memperjelas warna noda yang terbentuk (Ravelliani, *et al.*, 2021).

Flavonoid

Fase gerak dibuat dari campuran n- butanol: asam asetat: air (4:1:5) dengan penampak noda $AlCl_3$. Ekstrak yang mengandung flavonoid akan membentuk warna biru, kuning, atau hijau pada panjang gelombang 254 nm dan pengamatan pada panjang gelombang 254 nm akan terjadi perubahan warna biru tua (Hanani, 2015).

Tanin

Fase gerak dibuat dari campuran methanol: air (6:4) dengan penampakan noda $FeCl_3$ 5%, dimana reaksi positif yang terbentuk adalah noda berwarna hitam (Banu & Nagarajan, 2014). Selanjutnya dihitung nilai Rfnya.

Uji aktivitas antibakteri

Sterilisasi alat bahan

Penelitian menggunakan alat antara lain *glassware* sebelum digunakan, kemudian mencuci dahulu sampai bersih dan dikeringkan. Selanjutnya, membungkus alat menggunakan aluminium foil, dan disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit. Mensterilkan jarum ose

dan pinset dengan cara pemijaran. Kemudian, media yang digunakan juga disterilisasi menggunakan *autoclave* (Tanjung, *et al.*, 2020).

Pembuatan media agar

Menimbahan bahan NA sebanyak 20 gram dan melarutkan kedalam 1L akuades. Selanjutnya, memanskan larutan sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer* hingga homogen. Media disterilkan dalam *autoclave* selama 15 menit dengan suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm. Apabila proses sterilisasi selesai, memasukan media dalam cawan petri sebanyak 15 ml dan disimpan dalam lemari pendingin (Thiel, 1999).

Pembuatan konsentrasi ekstrak dan fraksi daun pakis giwang

Membuat konsentrasi ekstrak dalam variasi 80, 160 dan 320 mg/ml. Ekstrak kental daun Pakis giwang ditimbang sebanyak 0,32 gram dan dilarutkan dengan 0,9 ml metanol + 0,1 ml DMSO 10% hingga diperoleh konsentrasi larutan 320 mg/ml. Mengambil 0,5 ml dari larutan stok dan menambahkan metanol 0,5 ml, sehingga diperoleh konsentrasi 160 mg/ml. proses pengecerakan dilakukan dengan cara yang sama hingga didapat konsentrasi 80 mg/ml. Cara serupa dilakukan pada pembuatan konsentrasi fraksi daun dengan variasi konsentrasi 32 mg/ml, 16 mg/ml, dan 8 mg/ml.

Pembuatan kontrol positif dan negatif

Kloramfenikol digunakan sebagai kontrol positif. Kadar yang sensitif terhadap bakteri uji yaitu 30 µg. Pembuatannya dengan 30 mg kloramfenikol dilarutkan dalam 10 mL DMSO 10% kemudian diambil 10 µl sehingga diperoleh kadar 30 µl (Pratiwi, *et al.*, 2021). Konsentrasi DMSO 10% dibuat dengan cara DMSO dipipet sebanyak 10 mL dan ditambahkan akuades sebanyak 90 mL.

Penyiapan biakan bakteri uji

Mengambil biakan murni bakteri *S. aureus* sebanyak 1 ose. Kemudian, digoreskan pada NA padat dalam cawan petri secara aseptis agar terhindar dari kontaminasi. Selanjutnya, menutup kembali cawan petri dan menginkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dalam inkubator (Yanti & Mitika, 2017).

Pembuatan suspensi bakteri

Mengambil bakteri yang telah diinkulasi menggunakan ose steril lalu disuspensikan dalam tabung berisi larutan natrium klorida 0,9% sebanyak 5 mL, sampai didapatkan kekeruhan yang sama dengan standar kekeruhan larutan *Mc Farland* 0,5 (Aryani et al., 2020).

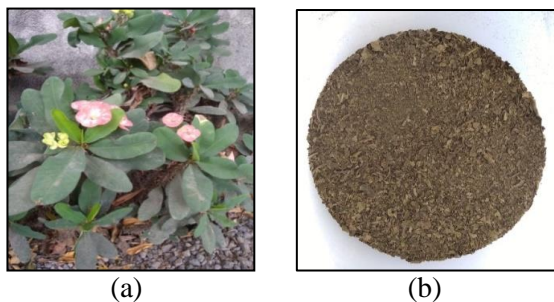
Uji aktivitas antibakteri

Metode difusi cakram digunakan untuk menguji aktivitas antibakteri pada bakteri patogen *S. aureus*. Kertas cakram berdiameter 6 mm. Menuangkan suspensi bakteri sebanyak 100 µL ke masing-masing cawan petri berisi media NA. Kertas cakram yang telah ditetesi 10 µL ekstrak *Euphorbia milii* dengan konsentrasi 320 mg/ml, 160 mg/ml, dan 80 mg/ml untuk ekstrak dan 32 mg/ml, 16 mg/ml, dan 8 mg/ml untuk fraksi, kontrol positif dan kontrol negatif diletakkan pada inokulasi bakteri uji dan diinkubasi selama 24 jam. Perlakuan ini sebanyak 3 kali replikasi. Apabila sudah 24 jam masa inkubasi maka dilakukan pengamatan. Diameter zona bening sekitar kertas cakram diukur untuk menghitung zona hambat (Tanjunget al., 2020; Nopiyanti et al, 2016).

Hasil dan Pembahasan

Pembuatan simplisia daun *Euphorbia milii*

Pengambilan sampel daun dari pekarangan rumah dilakukan pada pagi hari karena kandungan senyawa berkhasiat yang ada pada tumbuhan berada dalam keadaan maksimal di pagi hari (Hernani, 2012). Sampel penelitian telah dipastikan sebagai tanaman *Euphorbia milii* berdasarkan hasil determinasi dengan nomor 20/UN18/.7/LBL/2022. Diperoleh hasil serbuk simplisia dengan rendemen 18,8%.



Gambar 1. Sampel daun *E. milii*, dan serbuk simplisia

Ekstraksi dan fraksinasi

Proses ekstraksi dilakukan bertingkat menggunakan dua pelarut yaitu n-heksana dan metanol. Tujuan dilakukannya ekstraksi dengan pelarut n-heksana ialah menghilangkan zat-zat yang dapat menghalangi aktivitas biologi (Deklorofilasi). Proses fraksinasi ini mengacu pada prosedur yang dilakukan Elamin (2020), menggunakan pelarut etil asetat dan n-butanol.

Tabel 1. Data berat dan rendemen ekstrak metanol, dan fraksi n-butanol daun *Euphorbia milii*

Bahan	Berat bahan awal	Berat akhir	Rendemen
Ekstrak metanol	200 gram serbuk	10,9 gram	5,5%
Fraksi n-butanol	4 gram ekstrak	1,4 gram	35%

Skrining fitokimia

Hasil skrining fitokimia ekstrak metanol dan fraksi n-butanol *Euphorbia milii* menunjukkan hasil positif terhadap senyawa saponin, flavonoid, dan tanin. Hasil uji dapat dilihat pada Tabel 2.

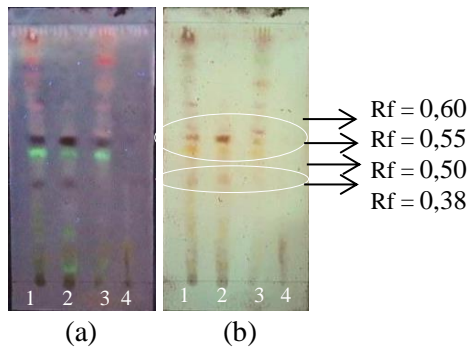
Tabel 2. Hasil Uji Skrining Fitokimia Ekstrak Metanol dan Fraksi n-butanol Daun *Euphorbia milii*

Golongan senyawa	Hasil pengamatan	Interpretasi hasil
Saponin	Terbentuk busa yang stabil >10 menit	+
Flavonoid	Perubahan warna menjadi jingga	+
Tanin	Perubahan warna menjadi hijau kehitaman	+

Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

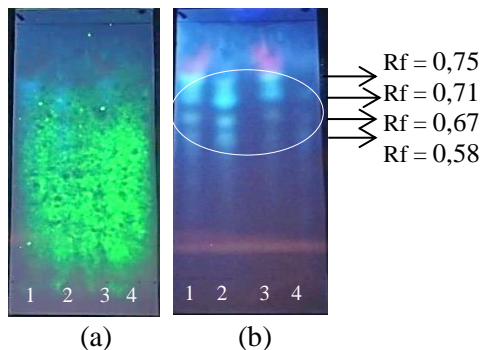
Kromatografi digunakan untuk mengisolasi kombinasi campuran menjadi bagian-bagiannya, dengan tujuan membedakan bagian-bagian senyawa yang berbeda pada sampel (Rosamah, 2019). Penegasan hasil uji skrining dilanjutkan dengan analisis kromatografi lapis tipis (KLT) untuk identifikasi senyawa flavonoid, tanin, dan saponin. Deteksi dilakukan secara fisika dengan diamati dibawah lampu UV 254 nm dan 366 nm, serta deteksi kimia dengan penampakan noda atau pereaksi semprot yang sesuai.

Saponin



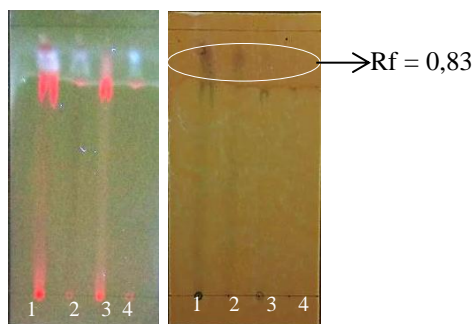
Gambar 2. Profil KLT saponin, (a) pengamatan dibawah UV 366 nm, (b) pengamatan pada sinar tampak setelah disemprot *Liebermann-burchard*. Keterangan: 1: Ekstrak metanol, 2: Fraksi n-butanol, 3: Fraksi EA, 4: Fraksi air

Flavonoid



Gambar 3. Profil KLT Flavonoid, (a) pengamatan dibawah UV 254 nm, (b) pengamatan dibawah UV 366 nm setelah disemprot $AlCl_3$. Keterangan: 1: Ekstrak metanol, 2: Fraksi n-butanol, 3: Fraksi EA, 4: Fraksi air

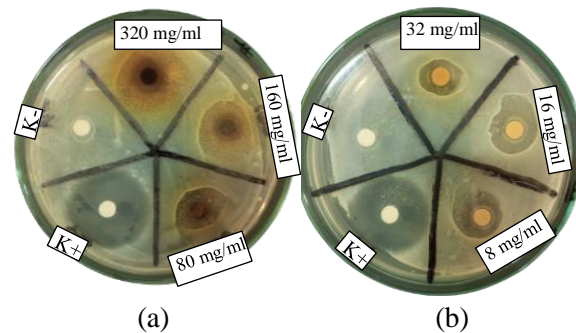
Tanin



Gambar 4. Profil KLT Tanin, (a) pengamatan dibawah UV 366 nm, (b) pengamatan pada sinar tampak setelah disemprot $FeCl_3$. Keterangan: 1: Ekstrak metanol, 2: Fraksi n-butanol, 3: Fraksi EA, 4: Fraksi air

Uji aktivitas antibakteri

Metode difusi cakram pada metanol dan fraksi n-butanol digunakan untuk pengujian bakteri secara *in vitro*. Pengujian bertujuan untuk mengetahui terbentuknya zona hambat dari perlakuan terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Diameter zona hambat atau zona bening disekitar kertas cakram merupakan tanda respon mikroorganisme terhadap zat antibakteri yang digunakan sebagai bahan uji dan ditunjukkan melalui diameter zona hambat.



Gambar 5. Aktivitas Antibakteri *Euphorbia milii* terhadap *S. aureus*, (a) Ekstrak metanol, (b) Fraksi n-butanol

Hasil pengamatan aktivitas antibakteri berdasarkan diameter zona hambat yang terbentuk dikelompokkan kedalam kategori berdasarkan daya kekuatan antibakteri menurut Davis & Stout (1971).

Tabel 3. Data hasil pengukuran diameter zona hambat ekstrak dan fraksi terhadap bakteri *S. aureus*

Perlakuan	Rata-rata Diameter Zona Hambat Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> (mm) \pm SD
K+	23,2 \pm 1,02
K-	0
Ekstrak 320 mg/ml	6,5 \pm 0
Ekstrak 160 mg/ml	4,2 \pm 0,54
Ekstrak 80 mg/ml	2,2 \pm 1,34
Fraksi 32 mg/ml	3,2 \pm 0,54
Fraksi 16 mg/ml	1 \pm 0,71
Fraksi 8 mg/ml	1 \pm 0,41

Keterangan:
 K+: Kloramfenikol (30 μ g), K-: DMSO 10%,
 Ekstrak: metanol, Fraksi: n-butanol.

Pembahasan

Skrining metabolit sekunder

Skrining fitokimia dilakukan dengan uji tabung dan uji kromatografi lapis tipis (KLT). Uji tabung meliputi saponin, flavonoid, dan tanin. Uji saponin menunjukkan hasil positif dengan timbulnya busa setinggi 1 cm yang stabil. Uji flavonoid menunjukkan hasil warna yang terbentuk baik dari ekstrak dan fraksi menunjukkan warna jingga/oranye. Perubahan warna menjadi hijau kehitaman menandakan hasil positif pada uji tanin. Ekstrak metanol dan fraksi n-butanol menunjukkan hasil uji yang sama yaitu positif mengandung saponin, flavonoid, dan tanin. Hasil ini sejalan dengan penelitian Gapuz & Ronnie (2018) dan Onoste *et al.*, (2020), yang menunjukkan daun *Euphorbia milii* positif mengandung saponin, flavonoid, dan tanin.

Penegasan hasil uji tabung dilanjutkan dengan analisis kromatografi lapis tipis (KLT). Berdasarkan hasil pengamatan saponin terlihat spot noda berwarna biru-violet hingga coklat. Suatu simplisia dikatakan mengandung saponin apabila dilakukan penyemprotan dengan LB memberikan noda berwarna biru, biru violet, kadang merah atau kuning coklat pada sinar tampak (Wagner, 1984). Berdasarkan hasil pada sinar tampak, ekstrak metanol menunjukkan warna biru-violet dengan pada Rf 0,38 dan 0,61. Sedangkan pada fraksi n-butanol menunjukkan noda biru-violet pada Rf 0,38 dan 0,60. Nilai Rf yang tidak berbeda jauh dan termasuk dalam rentang nilai standar menunjukkan ekstrak dan fraksi diduga mengandung senyawa yang sama yaitu saponin. Menurut Mirza (2016), rentang nilai Rf untuk saponin antara 0,57–0,98.

Pengamatan pada flavonoid menunjukkan adanya noda berwarna biru terang pada UV 366 nm. Fluoresen biru diidentifikasi sebagai senyawa flavonoid. Menurut Jafar (2016), setelah disemprot dengan $AlCl_3$ flavonoid akan memberikan warna biru pada UV 366 nm. Reagen semprot spesifik $AlCl_3$ membangun kompleks antara hidroksil dan keton dari sampel (ekstrak). Berdasarkan nilai Rf sampel ekstrak metanol berada di kisaran 0,54 - 0,76 dan fraksi n-butanol 0,51 - 0,75 untuk noda fluoresen biru. Menurut Harborne (1996), rentang nilai Rf untuk flavonoid diantara 0,31 – 0,98. Jadi,

ekstrak metanol dan fraksi n-butanol positif diduga mengandung senyawa flavonoid.

Identifikasi lebih lanjut pada tanin setelah dilakukan pemanasan pada plat KLT selama 5 menit terlihat bercak noda berwarna hitam pada sinar tampak. Hasil yang ditunjukkan sesuai dengan pernyataan Banu & Nagarajan (2014), bahwa positif adanya tanin ditunjukkan dengan terbentuknya noda berwarna hitam. Diperoleh 3 spot noda pada ekstrak metanol, dan 2 spot noda pada fraksi n-butanol (Tabel 4). Nilai Rf yang diduga sebagai senyawa tanin pada ekstrak dan fraksi ialah 0,83 karena berwarna hitam setelah disemprot $FeCl_3$. Hasil ini selaras dengan penelitian Banu & Nagarajan (2014). Beberapa penelitian menunjukkan adanya perbedaan hasil uji skrining, hal ini dapat dipengaruhi oleh pelarut yang digunakan dalam ekstraksi, tempat dan waktu panen sampel, dan lainnya. Secara keseluruhan daun *E. milii* positif mengandung saponin, flavonoid, dan tanin.

Uji aktivitas antibakteri

Ekstrak metanol dan fraksi n-butanol *Euphorbia milii* mampu menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* (Tabel 2). Besarnya kekuatan antibakteri bahan uji menentukan zona hambat yang terbentuk. Berdasarkan kategori kekuatan daya antibakteri Davis & Stout (1971), pada penelitian ini menunjukkan kontrol positif (kloramfenikol) termasuk ke dalam kategori sangat kuat karena zona hambat yang terbentuk ≥ 20 mm yaitu 23,2 mm. Ekstrak metanol pada konsentrasi tertinggi (320 mg/ml) mampu menghambat pertumbuhan *S. aureus* dengan zona hambat sebesar 6,5 mm (kategori sedang), sedangkan pada konsentrasi 160 mg/ml dan 80 mg/ml zona hambat yang terbentuk ≤ 5 mm (kategori lemah). Fraksi n-butanol konsentrasi 32 mg/ml, 16 mg/ml, dan 8 mg/ml menunjukkan adanya zona hambat kategori lemah sebesar ≤ 5 mm.

Penelitian yang dilakukan Ahmed *et al.*, (2023), aktivitas antibakteri ekstrak *E. milii* menggunakan metode difusi agar menghasilkan zona hambat sebesar 13-20 mm pada konsentrasi 320, 160 dan 80 mg/ml terhadap bakteri *S. aureus*. Hasil penelitian ini menghasilkan diameter zona hambat lebih kecil dibandingkan dengan penelitian Ahmed *et al.*, (2023). Salah satu unsur yang dapat

mempengaruhi perbedaan zona hambat adalah konsentrasi ekstrak. Besar kecilnya zona hambatan mempengaruhi ukuran dari zona hambat. (Prescott, 2005). Semakin tinggi konsentrasi maka reaksi penghambatan semakin kuat, hal ini sesuai dengan hasil eksplorasi dimana bentuk zona penghalang semakin meluas seiring dengan bertambahnya konsentrasi ekstrak dan fraksi.

Penggunaan kontrol negatif *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO) menunjukkan tidak adanya aktivitas antibakteri karena tidak terbentuknya zona bening disekitar kertas cakram. Hal ini menunjukkan bahwa kontrol negatif tidak berpengaruh dalam menghambat pertumbuhan *S. aureus*. Kloramfenikol kontrol positif dipilih karena mempunyai jangkauan aktivitas antibakteri yang luas, lebih spesifiknya dapat menghambat perkembangan mikroba Gram positif dan Gram negatif (Pratiwi, 2008). Komponen aktivitas kloramfenikol adalah dengan menekan campuran protein bakteri. Obat ini berikatan dengan subunit ribosom 50-an dan menghambat senyawa petridil transferase sehingga ikatan peptida tidak terbentuk pada campuran protein mikroba (Indijah dan Purnama, 2016). Hasil memperlihatkan terjadinya perbedaan hasil pengamatan diameter zona hambat yang besar antara kontrol positif dengan ekstrak dan fraksi. Perbedaan aktivitas antibakteri antara ekstrak, fraksi, dan kontrol positif menunjukkan adanya pengaruh dari kandungan metabolit sekunder pada sampel.

Aktivitas antibakteri yang dihasilkan berhubungan dengan kandungan senyawa metabolit yang dimiliki daun *E. milii*. Keberadaan saponin, flavonoid, serta tanin yang diidentifikasi melalui uji tabung dan KLT memiliki kontribusi dalam menghasilkan aktivitas antibakteri dengan mekanisme yang berbeda-beda. Fungsi saponin sebagai antibakteri adalah dengan mengurangi tegangan permukaan, menyebabkan peningkatan penetrasi atau tumpahan sel dan menyebabkan campuran intraseluler berdifusi keluar melalui lapisan luar dan dinding sel yang lemah dan kemudian berikatan dengan lapisan sitoplasma, mengganggu dan menurunkan stabilitas sel. Akibatnya terjadi kematian pada sel (Nuria, *et al.*, 2009).

Komponen aktivitas flavonoid sebagai antibakteri adalah membentuk campuran

kompleks dengan ekstraseluler dan memecah protein sehingga dapat merusak lapisan sel bakteri, diikuti dengan masuknya campuran intraseluler (Nuria *et al.*, 2009). Tanin berfungsi sebagai antibakteri dengan menahan protein ekstraseluler bakteri dan mengambil kendali atas substrat yang diperlukan untuk perkembangan bakteri. Tanin dapat menginvasi polipeptida dinding sel yang pada akhirnya menyebabkan kerusakan pada dinding sel (Sadiah *et al.*, 2022).

Pembuktian kandungan metabolit sekunder pada sampel dipertegas dengan KLT menunjukkan hasil yang lebih spesifik dari uji tabung, namun perlu penelitian lebih lanjut seperti isolasi senyawa pada sampel daun *E. milii*. Pada penelitian ini, kloramfenikol sebagai kontrol positif terbukti memiliki sensitivitas yang cukup tinggi terhadap pertumbuhan *S. aureus* ATCC 25923. Hal ini menunjukkan kloramfenikol dapat digunakan sebagai kontrol positif dalam pengujian antibakteri gram positif, dalam penelitian lebih lanjut dapat dibandingkan perbedaan hasil pada strain ATCC yang berbeda. Penggunaan kloramfenikol dapat digunakan untuk *S. aureus* jika terdapat resistensi atau intoleransi terhadap antibiotik seperti beta lactam. Untuk penelitian lebih lanjut, dapat dipilih kontrol positif yang utama digunakan dalam pengobatan *S. aureus* selain beta laktam.

Kesimpulan

Berdasarkan uji skrining fitokimia dan KLT, Ekstrak metanol dan fraksi n-butanol positif mengandung senyawa saponin, flavonoid, dan tanin. Pengujian aktivitas antibakteri menunjukkan ekstrak metanol dan fraksi n-butanol mampu menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus*, namun aktivitas yang dihasilkan tidak lebih besar dari kontrol positif dan tidak sama dengan kontrol negatif.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada pihak Program Studi Farmasi Universitas Mataram atas dukungan fasilitas dalam menyelesaikan penelitian ini.

Referensi

- Ahmed, M. S., Khan, I. J., Aman, S., Chauhan, S., Kaur, N., Shriwastav, S., Goel, K., Saini, M., Dhankar, S., Singh, T. G., Dev, J., & Mujwar, S. (2023). Phytochemical investigations, in-vitro antioxidant, antimicrobial potential, and in-silico computational docking analysis of *Euphorbia milii* Des Moul. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*. 11(2), 380 – 390. [https://doi.org/10.18006/2023.11\(2\).380.393](https://doi.org/10.18006/2023.11(2).380.393)
- Antimicrobial Resistance Collaborators. (2022) Global Burden of Bacterial Antimicrobial Resistance in 2019: A Systematic Analysis. *The Lancet*, 399, 629-655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- Aryani, P., Kusdiyantini, E., & Supriyadi, A. (2020). Isolasi Bakteri Endofit Daun Alang-Alang (*Imperata cylindrica*) dan Metabolit Sekundernya yang Berpotensi sebagai Antibakteri. *Jurnal Akademika Biologi*, 9(2): 20-28. URL:<https://ejournal3.undip.ac.id/index.php/biologi/article/view/29309nopiyanti>
- Banu, R.H., & Nagarajan, N. (2014). TLC and HPTLC fingerprinting of leaf extracts of *wedelia chinensis* (Osbeck) Merrill. *Jurnal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2(6): 29–23. URL: https://www.phytojournal.com/vol2Issue6/Issue_feb_2014/18.1.pdf
- Davis, W. W., & Stout T. R. (1971). Disc plate method of microbiological antibiotic assay. *American Society for Microbiology*, 4(22): 659-665. DOI: 10.1128/am.22.4.659-665.1971
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1995). *Farmakope Indonesia*, 4th ed. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta.
- Elamin, M. M. (2020). Solvent extraction and spectroscopy identification of bioactive compounds from medicinal shrub *Tamarix gallica*. *Functional Foods in Health and Disease*, 10(11): 456. DOI: <https://doi.org/10.31989/ffhd.v10i11.744>
- Gapuz, M. C. D., & Besagas, R. L. (2018). Phytochemical profiles and antioxidant activities of leaf extracts of euphorbia species. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences*. 12(4): 59-65. URL:<https://www.researchgate.net/publication/325110516>
- Hanani, E. (2015). *Analisis Fitokimia*. EGC. Jakarta.
- Harborne, J. (1996). *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Cetakan Kedua. Penerjemah: Padmawinata, K. dan I. Soediro. Penerbit ITB. Bandung.
- Harborne. (1987). *Metode Fitokimia : Penuntun cara modern menganalisis tumbuhan*. Edisi II. Terjemahan Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro. Penerbit ITB. Bandung.
- Hernani, T. M. (2012). *Teknologi Pascapanen Tanaman Obat*. Balai Besar Penelitian Dan Pengembangan Pascapanen Pertanian. Bogor.
- Indijah, S. W., & Purnama, F. (2016). *Farmakologi*. Kemenkes RI. Jakarta Selatan.
- Jafar, N., Maulidianti, S., Alfian, N., Noer, S. F., & Rusdi, M. (2016). Profil Kandungan Kimia Ekstrak Etanol Akar dan Klika Trembesi (*Samanea Saman*) Dengan Kromatografi Lapis Tipis Dan Pereaksi Pendeteksi. *Jurnal FARBAL*, 4(2), 45-50. <https://journal-uim-makassar.ac.id/index.php/farbal/article/view/474>
- Jones, W.P., & Kinghorn, A.D. (2006). Extraction of Plant Secondary Metabolites. In: Sharker, S.D. Latif Z., Gray A.L, eds. *Natural Product Isolation*. 2nd edition. Humana Press. New Jersey.
- Lady Yunita Handoyo, D., & Pranoto, M. E. (2020). Pengaruh Variasi Suhu Pengeringan Terhadap Pembuatan Simplisia Daun Mimba (*Azadirachta Indica*). *Jurnal Farmasi Tinctura*, 1(2): 45–54. DOI: <https://doi.org/10.35316/tinctura.v1i2.988>
- Mirza, A. (2016). Profil Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Ekstrak Etanol Biji Adas (*foeniculum vulgare* mill), Rimpang Kencur (*kaempferia galanga* l), Rimpang Kunyit Putih (*Curcuma zedoaria* (berg.) roscoe), Herba Pegangan (*centella*

- asiatica*) serta ramuannya. *Skripsi*. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Nuria, M.C., Faizatun. A., & Sumantri. (2009). Uji Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, dan *Salmonella typhi* ATCC 1408. *Jurnal Ilmu – ilmu Pertanian*. 5(2), 26 – 37. <http://dx.doi.org/10.31942/mediagro.v5i2.559>
- Onotse, O. C., Henrietta, I. N., Adeyemi, O. M., & Abisola, A. F. (2020). Antimicrobial Evaluation Of The Leaf Extract Of *Euphorbia milii*. Var Splendens. *African Journal of Pharmaceutical Research & Development*. 12(2), 199-207. URL: <https://ir.unilag.edu.ng/handle/123456789/9558>
- Pratiwi N.A. (2016). Uji Efektivitas Ekstrak Daun Pakis Giwang (*Euphorbia milii*) Terhadap Bakteri Methicillin Resisten *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Skripsi*. Fakultas Sains Dan Teknologi UIN Alauddin Makassar.
- Pratiwi, P. Y., Mardiyarningsih, A. Ismiyati, N., & Hery Setiyawan. (2021). Antibacterial Activity of Ethanolic Extract, n-Hexane Fraction, and Chloroform Fraction of Binahong Leaves (*Anredera Cordifolia*) on *Escherichia Coli* and its Phytochemical Screening. *Jurnal Jamu Indonesia*, 6(2), 84–91. DOI: <https://doi.org/10.29244/jji.v6i2.207>
- Pratiwi. (2008). *Mikrobiologi Farmasi*. Erlangga. Jakarta.
- Prescott, L.M, Harley, J.P & Klein, D.A., (2005). *Microbiology*, Ed Ke-6, McGraw-Hill, New York.
- Putra I. M. Agus .S. (2012). *Ekstrak Daun Kaktus Pakis Giwang (Euhphorbia milii) Menghambat Pertumbuhan Bakteri Methicillin – Resistant Staphylococcus aureus Secara In Vitro*. Tesis. Program Studi Ilmu Biomedik Program Pascasarjana Universitas Udayana Denpasar.
- Ravelliani, A., Nisrina, H., & Sari, L. K. (2021). Identifikasi Dan Isolasi Senyawa Glikosida Saponin Dari Beberapa Tanaman Di Indonesia. *Jurnal Sosial dan Sains*, 1(8), 786-799. DOI: 10.36418/sosains.v1i8.176.
- Rosamah, E. (2019). *Kromatografi Lapis Tipis: Metode Sederhana dalam Analisis Kimia Tumbuhan Berkayu*. Mulawarman University Press. Samarinda.
- Sadiyah, H. H., Cahyadi, A. I., & Windria, S. (2022). Kajian Daun Sirih Hijau (*Piper betle* L) Sebagai Antibakteri. *Jurnal Sain Veteriner*, 40(2), 128. <https://doi.org/10.22146/jsv.58745>
- Tanjung, M. J. P., Yoswaty, D., & Effendi, I. (2020). Antibacterial Activities of Soft Coral Extract *Lobophytum* sp. Towards Pathogenic Bacteria (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa*). *Jurnal Perikanan dan Kelautan*, 25(2), 151. DOI: <https://doi.org/10.31258/jpk.25.2.151-157thiel>
- Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, Nouwen JL. (2005). The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis* 5:751–762. doi: 10.1016/S1473-3099(05)70295-4
- Wagner, H. (1984). *Plant Drug Analysis A Thin Layer Chromatography Atlas*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York Tokyo.
- Yanti, Y. N., & Mitika, S. (2017). Uji Efektivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Sambiloto (*Andrographis Paniculata* Nees) Terhadap Bakteri *Staphylococcus Aureus*. *Jurnal Ilmiah Ibnu Sina*, 2(1), 158 – 168. DOI: <https://doi.org/10.36387/Jiis.V2i1.93>