

Aktivitas antimikroba fraksi dari ekstrak metanol daun senggani (*Melastoma candidum*) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Sa. typhimurium* serta profil kromatografi lapis tipis fraksi teraktif

Antimicrobial activity of fraction from methanolic extract of senggani (*Melastoma candidum*) leaves towards *Staphylococcus aureus* and *Sa. typhimurium* and thin layer chromatography profile of the most active fraction

IDA LIANA, OKID PARAMA ASTIRIN, ESTU RETNANINGTYAS NUGRAHENI

Jurusan Biologi FMIPA, Universitas Sebelas Maret. Jl. Ir. Sutami 36a, Surakarta 57126, Jawa Tengah

Manuskrip diterima: 14 Juni 2015. Revisi disetujui: 21 Agustus 2015.

Abstract. Liana I, OP Astirin, Nugraheni ER. 2015. Antimicrobial activity of fraction from methanolic extract of senggani (*Melastoma candidum*) leaves towards *Staphylococcus aureus* and *Sa. typhimurium* and thin layer chromatography profile of the most active fraction. *Biofarmasi* 13: 66-77. Controlling pathogen bacteria is important to prevent the spread of disease and infection. One of the solution is by antibiotic therapy. However, the use of antibiotic with inappropriate dose and time can cause bacterial resistance. Therefore, it is necessary to discover new antimicrobial compounds which can be used to control pathogen bacteria. One of the new antimicrobial compounds is secondary metabolites of Senggani (*Melastoma candidum* D. Don). The aim of this research is to know antimicrobial effect, percentage of MIC and MBC from the most active fraction of Senggani leaves towards *S. aureus* and *Sa. typhimurium*, and to know the most active fraction KLT profile of methanol extract of Senggani leaves. Separating bioactive components of Senggani leaves was done by macerating them with methanol solvent, then partitioning the solid and liquid matter using ether solvent, and fractionating them using chloroform, ethyl acetate and methanol solvent due to some proportions. Antimicrobial test was conducted using Kirby-Bauer diffusion method on MHA media towards *S. aureus* and *Sa. typhimurium*, whereas the determination of the percentage of MIC and MBC was conducted using dilution method on MHB media. The determination of chemical compounds group was done by KLT on the most active fraction using some specific spray reagents. The result of the research showed that Senggani leaves have antimicrobial activity towards *S. aureus* on F6 and *Sa. typhimurium* on F5. Both F5 and F6 have chemical compounds which belong to phenolic group, that is tannin, with the value R_f 9,40. MIC and MBC test shows that the percentage of MIC F6 towards *aureus* is 400 mg/mL, while the percentage of MBC can not be determined. Similarly, on MIC and MBC test towards *Sa. typhimurium*, the percentage MIC, and MBC cannot be determined.

Keywords: *Melastoma candidum*, antimicrobial test, MIC and MBC, phenols, tannins

PENDAHULUAN

Staphylococcus auerus dan *Salmonella typhimurium* merupakan bakteri patogen, yaitu bakteri yang memiliki kemampuan menimbulkan penyakit pada manusia. Pengendalian bakteri patogen penting dilakukan untuk mencegah penyebaran penyakit dan infeksi, serta membasmi bakteri patogen pada inang yang terinfeksi. Bakteri patogen dapat dihambat pertumbuhannya atau dibunuh dengan proses fisik (misalnya dengan pemanasan) atau bahan kimia (misalnya dengan antibiotik).

Terapi antibiotik beberapa tahun lalu dinyatakan berhasil dalam mengatasi penyebaran bakteri patogen. Akan tetapi, penggunaan antibiotik dengan dosis dan waktu terapi yang tidak tepat dapat menimbulkan masalah tersendiri, yaitu resistensi bakteri. Pada tahun 1944 hampir seluruh *Staphylococcus* yang diisolasi dari rumah sakit sensitif terhadap antibiotik penisilin, tetapi pada tahun 1948 sekitar 65%-85% menjadi resisten terhadap penisilin-G karena banyaknya penggunaan preparat penisilin di

rumah sakit. Pada tahun 1984, *Staphylococcus* resisten penisilin tidak hanya ditemukan di rumah sakit, tetapi juga pada 80% *Staphylococcus* yang diisolasi dari masyarakat (Sjahrurahman et al. 1999; Jawetz et al. 2001). Selain itu, *S. aureus* yang diisolasi dari susu segar kambing kini juga resisten terhadap tetrasiklin sefotaksim, ampicilin dan eritromisin (Purnomo et al. 2006). Ada pula strain *S. aureus* yang resisten terhadap metisilin yaitu strain *Meticillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA). Strain ini juga resisten terhadap sparfloksasin, sefaklor, asam nalidiksik dan eritromisin (Sjahrurahman et al. 1999; Mycek et al. 2001; Syarif et al. 2001).

Bakteri *Salmonella* pada binatang juga berkembang menjadi resisten, terutama terhadap tetrasiklin yang digunakan dalam makanan ternak. *Sa. typhi* strain *Multi Drug Resistance* (MDR) resisten terhadap dua atau lebih jenis antibiotik yang sering digunakan, yaitu ampicilin, kloramfenikol, dan kotrimoksazol (Mycek et al. 2001, Hadinegoro 1999). Mengacu pada permasalahan di atas, diperlukan adanya penemuan senyawa-senyawa antimikroba

baru yang dapat digunakan untuk mengendalikan bakteri patogen, diantaranya adalah senyawa metabolit sekunder dari senggani (*Melastoma candidum* D. Don).

Menurut Retnaningtyas dan Mulyani (2008), ekstrak metanol daun senggani dengan konsentrasi 20-100% memiliki aktivitas antibakteri dengan diameter zona hambatan sebesar 17,44-23,99 mm terhadap *S. aureus*, serta memiliki aktivitas penghambatan yang kuat hingga sangat kuat terhadap pertumbuhan beberapa bakteri lain seperti *Sa. typhi*, *Bacillus subtilis*, *Shigella dysenteriae*, dan *E. coli*. Wang dan Hsu (2007) juga melaporkan bahwa ekstrak aseton daun senggani memiliki aktivitas antibakteri terhadap *B. cereus*. Daun senggani memiliki kandungan senyawa golongan tanin terhidrolisis yaitu Nobotanin B yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Helicobacter pylori* (Funatogawa et al. 2004). Selain tanin, kandungan kimia daun senggani yang telah diketahui antara lain flavonoid dan saponin (Hariaman 2008; Sentra Informasi IPTEK 2009).

Flavonoid yang merupakan senyawa fenol dapat menyebabkan penghambatan terhadap sintesis dinding sel (Mojab et al. 2008). Flavonoid yang merupakan senyawa fenol dapat bersifat koagulator protein (Dwijoseputro. 1994). Protein yang menggumpal tidak akan dapat berfungsi lagi sehingga akan mengganggu pembentukan dinding sel bakteri. Pada konsentrasi yang biasa digunakan (larutan dalam air 1-2%), fenol dan derivatnya menimbulkan denaturasi protein (Jawetz et al. 2001). Saponin merupakan zat hemolitik yang kuat serta memiliki sifat seperti sabun. Saponin juga bersifat spermisida, antimikrobia, antiperadangan dan memiliki aktivitas sitotoksik (Tjay dan Rahardja 2002). Kandungan senyawa kimia lain, yaitu tanin, mempunyai sifat sebagai pengelat berefek spasmolitik, yang dapat mengerutkan membran sel sehingga mengganggu permeabilitas sel. Akibat terganggunya permeabilitas, sel tidak dapat melakukan aktivitas hidup sehingga pertumbuhannya terhambat atau bahkan mati. Efek antibakteri tanin antara lain melalui reaksi dengan membran sel, inaktivasi enzim dan destruksi atau inaktivasi fungsi materi genetik (Ajizah 2004).

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek antimikroba fraksi dari ekstrak metanol daun senggani terhadap *S. aureus* dan *Sa. typhimurium*. Mengetahui nilai MIC dan MBC fraksi teraktif dari ekstrak metanol daun senggani terhadap *S. aureus* dan *Sa. typhimurium*; serta mengetahui profil Kromatografi Lapis Tipis fraksi teraktif dari ekstrak metanol daun senggani.

BAHAN DAN METODE

Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Pusat MIPA dan Laboratorium Jurusan Biologi, Fakultas MIPA Universitas Sebelas Maret, Surakarta selama Bulan Juni-November 2009.

Alat dan bahan

Lampu UV254 dan UV366, chamber, rotary evaporator (Heidolph vv 2000, Germany), oven (Memert, Germany),

gelas beker dan alat-alat gelas lainnya. Tabung reaksi, pinset, cawan petri, pipet volume, mikropipet, gelas beker, jarum ose, bunsen, perforator (pencetak lubang), LAF, sarung tangan dan masker.

Bahan utama untuk penelitian ini adalah serbuk kering daun senggani yang diperoleh dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TO2T) Tawangmangu. Metanol (untuk maserasi), eter (untuk partisi padat-cair), Silika gel GF254 (E. Merck) berukuran lebih dari 60 µm sebagai fase diam, dan fase gerak yang digunakan yaitu kloroform, etil asetat dan metanol (untuk VLC). Plat silika gel 60 GF254, kloroform, n-heksan, etil asetat, wasbensin, pereaksi semprot serum (IV) sulfat, $AlCl_3$, $FeCl_3$, $SbCl_3$, Lieberman-Burchard dan vanilin asam sulfat. Biakan murni *S. aureus* strain ATCC 6538 dan *Sa. typhimurium* strain ATCC 13311, media NA, NB, MHA, MHB, amoksisilin (2,5 mg/mL), CMC (1 mg/mL) dan akuades.

Cara kerja

Penyiapan sampel

Sampel yang digunakan adalah serbuk kering daun senggani. Simplisia daun senggani diperoleh dan dideterminasi di B2P2TO2T Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah pada tahun 2009.

Penyiapan bakteri uji

Bakteri yang digunakan pada penelitian ini adalah *S. aureus* strain ATCC 6538 dan *Sa. typhimurium* strain ATCC 13311. Biakan murni *S. aureus* strain ATCC 6538 dan *Sa. typhimurium* strain ATCC 13311 terlebih dahulu diregenerasikan pada media NA untuk memperbanyak jumlah (stok) bakteri yang akan digunakan untuk uji.

Regenerasi bakteri dilakukan dengan menumbuhkan 1-2 ose bakteri ke dalam 10 mL media cair NB kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam dengan pengocokan di atas shaker pada kecepatan 150 rpm. Pengocokan dilakukan agar bakteri dapat tumbuh optimal dalam media NB. Setelah 24 jam, bakteri dari media NB diinokulasi dengan metode agar miring pada media NA kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C agar bakteri dapat tumbuh dengan optimal. Setelah diinkubasi selama 24 jam, kultur bakteri kemudian disimpan dalam lemari pendingin dengan suhu 4°C agar pertumbuhan bakteri tidak terjadi dan bakteri tidak segera mati.

Pemisahan komponen bioaktif

Pada penelitian ini untuk memisahkan komponen bioaktif digunakan ekstraksi, partisi, dan fraksinasi. Ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut metanol. Tahap selanjutnya dilakukan partisi menggunakan pelarut eter dengan sentrifugasi. Selanjutnya dilakukan fraksinasi menggunakan VLC dengan sistem fase gerak bertingkat dengan kepolaran yang berbeda.

Ekstraksi

Serbuk kering daun senggani dimaserasi menggunakan metanol selama 24 jam. Setelah 24 jam, rendaman disaring dengan corong gelas, ampasnya dipisahkan dan filtrat I yang diperoleh diuapkan dengan bantuan rotary evaporator sehingga didapat ekstrak metanol yang kemudian

dikeringanginkan dan disimpan di eksikator. Ampas kemudian dimaserasi kembali seperti cara di atas sebanyak tiga kali sehingga diperoleh filtrat II dan III lalu diuapkan menggunakan *rotary evaporator*. Tahap selanjutnya seperti pada filtrat I sehingga diperoleh ekstrak metanol.

Partisi

Proses partisi yang dilakukan merupakan partisi padat-cair dengan menggunakan pelarut eter. Ekstrak metanol yang didapatkan dari proses maserasi dipartisi dengan cara sentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama 10 menit sehingga diperoleh bagian yang larut dan tidak larut pada eter. Bagian yang larut dan tidak larut masing-masing diuapkan sehingga diperoleh bagian kering. Selanjutnya kedua bagian masing-masing dipantau profil kandungan senyawa kimianya menggunakan kromatografi lapis tipis dengan fase gerak kloroform:etil asetat (1:9 v/v). Profil KLT yang menunjukkan hasil pemisahan kandungan kimia yang tidak tumpang tindih antara bagian yang larut dan bagian tidak larut dipilih untuk proses *scalling up* pada tahap partisi. Bagian ini kemudian diuji aktivitas antimikrobanya terhadap *S. aureus* dan *Sa. typhimurium*. Bagian yang menunjukkan luas zona hambat terbesar merupakan bagian aktif yang selanjutnya dipilih untuk difraksinasi agar didapatkan komponen senyawa yang lebih sederhana.

Fraksinasi

Fraksinasi dilakukan terhadap hasil partisi teraktif menggunakan VLC dengan sistem fase gerak bertingkat menurut kepolarannya yaitu dari pelarut yang kurang polar ke pelarut yang lebih polar, sehingga dihasilkan beberapa fraksi. Masing-masing fraksi yang dihasilkan kemudian diuji antibakteri terhadap *aureus* dan *Sa. typhimurium*. Fraksi teraktif kemudian dianalisis dengan kromatografi lapis tipis untuk penentuan golongan senyawa fraksi teraktifnya serta ditentukan nilai MIC dan MBC-nya. Perbandingan pelarut yang digunakan pada VLC yaitu:

1. CHCl₃ 100%
2. CHCl₃: EtoAc (2:1 v/v)
3. CHCl₃: EtoAc (1:1 v/v)
4. CHCl₃: EtoAc (1:3 v/v)
5. CHCl₃: EtoAc (1:5 v/v)
6. CHCl₃: EtoAc (1:9 v/v)
7. CHCl₃: EtoAc (1:15 v/v)
8. CHCl₃: MeOH (1:1 v/v)
9. CHCl₃: MeOH (2:1 v/v)
10. CHCl₃: MeOH (3:1 v/v)
11. CHCl₃: MeOH (6:1 v/v)
12. MeOH 100%

Uji antimikroba terhadap pertumbuhan bakteri *S. aureus* dan *Sa. typhimurium*

Pengujian daya hambat terhadap *S. aureus* dan *Sa. typhimurium* dilakukan dengan metode difusi sumuran (*well diffusion method*) dari Kirby-Bauer (1966). Biakan murni *S. aureus* dan *Sa. typhimurium* masing-masing diregenerasi dalam media NA dengan metode agar miring dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Uji antibakteri dilakukan dalam kondisi yang steril agar tidak terjadi kontaminasi. Sterilisasi dilakukan terhadap alat, bahan dan ruangan yang akan digunakan. Sterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C. Sterilisasi media membutuhkan waktu 15-20 menit sedangkan sterilisasi alat membutuhkan waktu 30 menit. Uji antimikroba dilakukan dalam LAF pada keadaan steril sehingga diperlukan adanya penyinaran sinar UV selama 2 jam dan disemprot dengan alkohol 70% sebagai disinfektan.

Sebanyak 1-2 ose bakteri uji dikulturkan dalam 10 mL media MHB, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam dengan dilakukan pengocokan menggunakan *shaker* pada kecepatan 150 rpm. Konsentrasi kultur sel diencerkan dalam 100 mL media MHA steril hingga mencapai 1 X 10⁶ CFU/mL. Media MHA sebanyak 10 mL dituangkan dalam cawan petri kemudian didiamkan hingga memadat. Setelah memadat, media MHA dalam cawan petri yang telah diinokulasi *S. aureus* atau *Sa. typhimurium* tersebut kemudian dibuat lubang/sumuran dengan menggunakan perforator dengan diameter 7 mm. Dalam satu cawan petri dapat dibuat dua atau tiga sumuran sesuai dengan keperluan atau jumlah pengulangan yang dilakukan.

Sampel uji sebanyak 25 µL dimasukkan dalam tiap sumuran pada media MHA dengan konsentrasi 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 dan 1000 mg/mL. Masing-masing konsentrasi dibuat sebanyak dua pengulangan (duplo). Cawan petri selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah diinkubasi, pertumbuhan bakteri diamati dan diukur besarnya diameter zona hambat yang terbentuk berupa zona bening di sekeliling sumuran.

Diameter zona hambat yang terbentuk diukur menggunakan jangka sorong. Pengukuran dilakukan 3 kali pada sisi yang berbeda atau pada ketiga titik daerahnya. Dari kedua pengulangan untuk konsentrasi yang sama kemudian dibuat hasil rata-rata. Sebagai kontrol digunakan metanol, eter, akuades, CMC (1 mg/mL) dan amoksisilin (2,5 mg/mL).

Kromatografi Lapis Tipis dan penentuan golongan fraksi teraktif

Setiap proses pemisahan pada tahap ekstraksi, partisi dan fraksinasi dipantau profil kandungan senyawa kimianya dengan KLT. Hasil ekstraksi, partisi maupun fraksinasi dilarutkan pada pelarut kemudian ditotolkan pada lempeng silika gel 60 GF254 menggunakan pipa kapiler. Pengembangan dilakukan dalam bejana pengembangan dengan jarak pengembangan 8 cm dan menggunakan fase gerak yang sesuai.

Spot-spot yang terbentuk pada plat KLT diamati di bawah sinar UV254 dan UV366. Selanjutnya plat KLT disemprot dengan serum (IV) sulfat untuk mendeteksi keberadaan senyawa organik secara umum dan berbagai pereaksi semprot spesifik untuk menentukan golongan senyawa aktif. Pereaksi semprot spesifik yang digunakan adalah sebagai berikut:

FeCl₃ 1%: sebanyak 0,1 g FeCl₃ dilarutkan dalam 10 mL akuades. Pereaksi semprot ini digunakan untuk mendeteksi adanya senyawa tanin dan fenolat. Sampel

dinyatakan positif mengandung tanin dan fenolat jika terbentuk warna hijau, merah atau biru setelah penyempotan (Harborne 2006).

AlCl_3 1%: sebanyak 0,1 g AlCl_3 dilarutkan dalam 10 mL etanol 95%. Pereaksi semprot ini digunakan untuk mendeteksi adanya senyawa flavonoid. Sampel dinyatakan positif mengandung flavonoid jika terbentuk fluoresensi hijau kuning dengan sinar UV366 setelah penyempotan (Harborne 2006).

Vanillin asam sulfat: terdiri atas 5% H_2SO_4 dalam etanol dan 1% vanilin dalam etanol. Deteksi dilakukan dengan menyempot plat silika dengan larutan 5% H_2SO_4 dalam etanol kemudian disempot kembali dengan larutan 1% vanilin dalam etanol. Pereaksi semprot ini digunakan untuk mendeteksi adanya senyawa terpenoid. Sampel dikatakan positif mengandung senyawa terpenoid jika terbentuk warna ungu, biru, biru-ungu, atau orange ke merah ungu setelah dilakukan penyempotan (Harborne 2006).

SbCl_3 20% dalam kloroform: sebanyak 2 g serbuk SbCl_3 dilarutkan dalam 10 mL kloroform. Pereaksi semprot ini digunakan untuk mendeteksi adanya senyawa saponin. Sampel dikatakan positif mengandung saponin jika terbentuk warna merah violet setelah disempot dengan SbCl_3 (Santosa dan Hertiani 2005).

Lieberman-Burchard: sebanyak 5 mL anhidrida asam asetat dicampurkan dengan 5 mL asam sulfat pekat. Campuran ini kemudian ditambahkan dalam 50 mL etanol absolut. Setiap pencampuran zat dilakukan dengan pendinginan. Pereaksi semprot ini digunakan untuk mendeteksi adanya senyawa steroid dan terpenoid. Sampel dikatakan positif mengandung steroid jika terbentuk warna biru dan dinyatakan positif mengandung terpenoid jika terbentuk warna merah (Permana 2009).

Setelah disempot dengan pereaksi semprot spesifik, plat KLT dipanaskan dalam oven selama 10 menit dengan suhu 100°C. Penentuan golongan senyawa aktif dilakukan terhadap fraksi teraktif dari uji daya hambat terhadap *S. aureus* dan *Sa. typhimurium*.

Uji MIC dan MBC

Penentuan nilai MIC dan MBC dilakukan dengan metode dilusi. Inokulum dari *S. aureus* dan *Sa. typhimurium* diperoleh dari koloni segar yang tumbuh pada media NA. Masing-masing spesies bakteri diinokulasi pada 10 mL MHB dalam erlenmeyer (50 mL), kemudian diinkubasi selama 24 jam dengan *shaker* pada kecepatan 150 rpm. Setelah 24 jam, sebanyak 200 μL inokulum dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi 5 mL media MHB.

Fraksi teraktif daun senggani dipersiapkan dalam bentuk pengenceran berseri dengan konsentrasi 100, 200, 300, 400, dan 500 mg/mL. Masing-masing pengenceran ditambahkan sebanyak 100 μL ke dalam tabung reaksi yang telah berisi inokulum bakteri. Selanjutnya tabung reaksi diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Bakteri dalam tabung yang tidak menunjukkan pertumbuhan kemudian disubkultur dalam media tanpa senyawa uji untuk menentukan apakah hambatan ini permanen atau tidak. Apabila pada uji lanjut terdapat pertumbuhan bakteri, maka konsentrasi tersebut dinyatakan sebagai nilai MIC.

Sebaliknya, apabila pada uji lanjut tidak terdapat pertumbuhan bakteri, maka konsentrasi tersebut dinyatakan sebagai nilai MBC.

Analisis data

Analisis deskriptif dilakukan terhadap profil KLT pada komponen senyawa ekstrak metanol, hasil partisi serta hasil fraksinasi sebelum digunakan untuk uji antimikroba. Hasil pengukuran dari zona hambat pada uji antimikroba dibandingkan antara satu dengan yang lainnya. Komponen senyawa teraktif pada uji antimikroba adalah yang memiliki diameter zona hambat terbesar.

Penentuan nilai MIC dan MBC dilakukan pada hasil fraksi yang memiliki aktivitas antimikroba terbesar. Nilai MIC dan MBC ditentukan setelah dilakukan uji lanjut. Apabila pada uji lanjut terdapat pertumbuhan bakteri, maka konsentrasi tersebut dinyatakan sebagai nilai MIC. Sebaliknya, apabila pada uji lanjut tidak terdapat pertumbuhan bakteri, maka konsentrasi tersebut dinyatakan sebagai nilai MBC.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penyiapan bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah serbuk simplisia daun senggani. Simplisia menurut Depkes RI (1995a) didefinisikan sebagai bahan alamiah yang dipergunakan sebagai obat yang belum mengalami pengolahan apapun, serta kecuali dikatakan lain, berupa bahan yang telah dikeringkan. Proses pengeringan daun senggani dilakukan di B2P2TO2T menggunakan alat pengering dengan suhu 40°C selama 30 jam. Pengeringan dilakukan agar reaksi enzimatis tidak berjalan dan mencegah pertumbuhan mikroba pada simplisia daun senggani. Daun yang telah kering kemudian dibuat serbuk untuk memperluas daerah penarikan kandungan kimia, sehingga pada proses ekstraksi, kontak antara pelarut dengan sampel lebih efektif dan senyawa dapat terekstrak dengan optimal.

Menurut Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat (Depkes RI 2000) dan Sembiring et al. (2006), proses pembuatan serbuk simplisia dapat mempengaruhi kualitas ekstrak sehingga harus dilakukan dengan hati-hati. Apabila serbuk terlalu kasar, maka daerah penyerapan kandungan kimia oleh pelarut akan semakin sempit sehingga proses ekstraksi kurang optimal. Namun sebaliknya, apabila serbuk terlalu halus, maka akan semakin rumit secara teknologi peralatan untuk tahapan filtrasi karena senyawa yang tidak diinginkan maupun debris sel pada simplisia akan terikut pada ekstrak sehingga mempengaruhi kualitas ekstrak. Selain itu, selama penggunaan peralatan penyerbukan dimana ada gerakan dan interaksi dengan benda keras, misalnya logam, maka akan timbul panas yang dapat berpengaruh pada senyawa kandungan. Selain dipengaruhi oleh proses penyerbukan dan interaksi dengan logam, kualitas ekstrak juga dipengaruhi oleh stabilitas senyawa dalam ekstrak itu sendiri, oksidasi, cahaya, derajat keasaman (Depkes RI 2000), pemanasan dan jenis pelarut (Srijanto et al. 2004; Tensiska et al. 2007). Setelah

didapatkan serbuk simplisia daun senggani, kemudian dilakukan ekstraksi dengan metode maserasi.

Ekstraksi dan uji antimikroba ekstrak

Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (Depkes RI. 1995b). Pelarut metanol digunakan untuk proses ekstraksi pada penelitian ini. Menurut Noor et al. (2006), metanol banyak digunakan untuk ekstraksi tanaman obat dan dapat menarik zat aktif yang terkandung di dalamnya sebanyak-banyaknya. Hasil ekstraksi berupa ekstrak kental berwarna hijau kecoklatan. Menurut Retnaningtyas dan Mulyani (2008), ekstrak metanol daun senggani memiliki aktivitas penghambatan yang kuat terhadap *S. aureus*, *Sa. typhi*, *B. subtilis*, *Sh. dysenteriae* dan *E. coli*.

Metode ekstraksi yang digunakan pada penelitian ini adalah metode maserasi. Maserasi merupakan suatu metode ekstraksi simplisia cara dingin (tanpa pemanasan) yang dilakukan dengan menggunakan pelarut, disertai dengan beberapa kali pengadukan pada temperatur ruang (Depkes RI 2000). Maserasi dilakukan dengan merendam serbuk simplisia daun senggani dalam pelarut hingga seluruh serbuk simplisia terendam seluruhnya. Larutnya kandungan kimia simplisia saat proses maserasi, umumnya akan terjadi apabila pelarut menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel. Di dalam rongga sel terdapat senyawa aktif yang dapat larut di dalam pelarut. Perbedaan konsentrasi antara larutan senyawa aktif di dalam sel dengan diluar sel menyebabkan larutan dengan konsentasi tinggi didesak keluar ke konsentrasi rendah. Apabila telah terjadi keseimbangan konsentrasi di dalam dan di luar sel, maka proses ekstraksi berhenti. Maka, pada proses maserasi disertai pula dengan pengadukan agar terjadi perputaran pelarut sehingga akan merubah profil konsentrasinya dan proses ekstraksi akan terjadi secara optimal.

Struktur kimia berbagai senyawa berbeda yang terkandung dalam daun senggani akan mempengaruhi kelarutan serta stabilitas senyawa-senyawa tersebut terhadap berbagai faktor seperti pemanasan, udara, cahaya, serta logam berat (Depkes RI 2000; Srijanto et al. 2004; Tensiska et al. 2007). Metode maserasi tidak menggunakan pemanasan, sehingga pengaruh negatif akibat pemanasan terhadap senyawa termolabil yang mungkin terdapat dalam daun senggani dapat dihindari. Proses maserasi dilakukan menggunakan wadah terbuat dari kaca untuk menghindari terjadinya reaksi kimia antara pelarut maupun senyawa kimia yang tersari dengan wadahnya, karena sifat kaca yang lebih stabil (tidak mudah bereaksi) daripada plastik maupun logam. Selama proses maserasi, wadah selalu dalam keadaan tertutup untuk menghindari kemungkinan terjadinya proses oksidasi oleh udara luar. Maserasi juga dilakukan di dalam ruangan tertutup untuk menghindari pengaruh cahaya (sinar matahari) terhadap stabilitas senyawa-senyawa yang akan diambil.

Hasil maserasi (maserat) kemudian disaring dan dilakukan pemekatan. Pemekatan berarti peningkatan

jumlah *partial solute* (senyawa terlarut) hingga terbentuk ekstrak yang pekat atau kental, sehingga tidak terdapat lagi pelarut dalam ekstrak. Pemekatan dilakukan dengan bantuan *rotary evaporator*. *Rotary evaporator* digunakan agar proses pemekatan menjadi lebih cepat serta pelarut yang digunakan dapat diperoleh kembali sehingga lebih efisien. Ekstrak yang telah diperoleh kemudian disimpan dalam eksikator untuk menghindari kerusakan senyawa kimia dalam ekstrak.

Ekstrak kemudian diuji aktivitas penghambatannya terhadap *S. aureus* strain ATCC 6538 dan *Sa. typhimurium* strain ATCC 13311. Uji antimikroba ekstrak metanol daun senggani terhadap pertumbuhan bakteri dilakukan dengan menggunakan metode difusi sumuran (*well diffusion method*) dari Kirby-Bauer (1966) menggunakan media MHA. Ekstrak metanol daun senggani diujikan pada *S. aureus* dan *Sa. typhimurium* dengan konsentrasi 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 dan 1000 mg/mL. Sebagai kontrol digunakan CMC (1 mg/mL), metanol dan antibiotik amoksisilin (2,5 mg/mL). Amoksisilin digunakan karena merupakan antibiotik yang berspektrum luas, meliputi bakteri Gram positif dan negatif, aerobik dan anaerobik, serta dapat larut dalam air (Mutschler. 1991; Tjay dan Rahardja 2002) sehingga lebih memudahkan dalam penggunaannya.

Hasil pengujian menunjukkan bahwa seluruh konsentrasi ekstrak daun senggani yang diujikan memiliki aktivitas penghambatan terhadap pertumbuhan *S. aureus* maupun *Sa. typhimurium*. Aktivitas penghambatan ini ditunjukkan dengan adanya zona bening (zona hambat) di sekitar sumuran. Hasil pengukuran zona hambat ekstrak metanol daun senggani terhadap *S. aureus* dan *Sa. typhimurium* seperti disajikan pada Tabel 1.

Davis dan Stout (1971) menyatakan bahwa apabila zona hambat yang terbentuk pada uji difusi agar berukuran kurang dari 5 mm, maka aktivitas penghambatannya dikategorikan lemah. Apabila zona hambat berukuran 5-10 mm dikategorikan sedang, 10-19 mm dikategorikan kuat dan 20 mm atau lebih dikategorikan sangat kuat. Hasil pengukuran zona hambat (Tabel 1) menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun senggani memiliki aktivitas penghambatan yang sedang terhadap pertumbuhan *S. aureus* pada konsentrasi 100 mg/mL, sedangkan konsentrasi 200-1000 mg/mL menunjukkan adanya aktivitas penghambatan yang kuat, dimana zona hambat terbesar pada konsentrasi 900 mg/mL dengan diameter zona hambat 13,835 mm. Aktivitas penghambatan ekstrak metanol terhadap pertumbuhan *Sa. typhimurium* pada konsentrasi 100-300 mg/mL tergolong sedang dan pada konsentrasi 400-1000 mg/mL tergolong kuat dengan zona hambat terbesar pada konsentrasi 900 mg/mL dengan diameter zona hambat sebesar 14,615 mm.

Tabel 1 menunjukkan bahwa kontrol metanol dan CMC (1 mg/mL) tidak menunjukkan adanya aktivitas penghambatan baik terhadap *S. aureus* maupun *Sa. typhimurium*. Sebaliknya, amoksisilin (2,5 mg/mL) menunjukkan aktivitas penghambatan yang tergolong sedang terhadap *S. aureus* dengan diameter zona hambat sebesar 5,400 mm dan tergolong kuat terhadap *Sa. typhimurium* dengan diameter zona hambat sebesar 12,030

mm. Hal ini mengindikasikan bahwa walaupun memiliki aktivitas penghambatan yang tergolong kuat, namun jika dibandingkan dengan amoksisilin, maka aktivitas penghambatan ekstrak metanol daun senggani terhadap *S. aureus* dan *S. typhimurium* masih tergolong kecil. Gambar 1 menunjukkan diameter zona hambat terbesar ekstrak metanol terhadap *S. aureus* dan *Sa. typhimurium*.

Sensitivitas *S. aureus* terhadap ekstrak metanol daun senggani tergolong kuat mulai dari konsentrasi 200 mg/mL, sedangkan pada *Sa. typhimurium* diperlukan konsentrasi ekstrak yang lebih tinggi, yaitu 400 mg/mL. Hal ini juga dilaporkan oleh Rahayu (2000), Yuharmen (2002), Kusmiyati dan Agustini (2007), serta Handayani et al. (2008) yang menyatakan bahwa bakteri Gram positif pada umumnya memiliki sensitivitas yang lebih tinggi terhadap senyawa antimikroba dibandingkan dengan bakteri Gram negatif. Perbedaan sensitivitas bakteri Gram positif dan Gram negatif terhadap antimikroba ini dapat dipengaruhi karena adanya perbedaan struktur dinding sel pada kedua golongan bakteri tersebut.

Staphylococcus aureus merupakan bakteri Gram positif, dimana dinding selnya tersusun atas peptidoglikan yang sangat tebal (Williams et al. 1996, Jawetz et al. 2001). Proses perakitan dinding sel diawali dengan pembentukan rantai peptida yang akan membentuk jembatan silang peptida dan menggabungkan rantai glikan dari peptidoglikan pada rantai lain sehingga menyebabkan dinding sel terakit sempurna. Penghambatan pada perakitan dinding sel mengakibatkan penggabungan rantai glikan tidak terhubung silang ke dalam peptidoglikan dinding sel menuju suatu struktur yang lemah dan menyebabkan kematian bakteri (Morin dan Gorman 1995). Kerusakan pada dinding sel atau hambatan pada pembentukannya dapat berakibat lisis pada sel (Jawetz et al. 2001). Lisisnya sel bakteri tersebut dikarenakan tidak berfungsinya lagi dinding sel yang mempertahankan bentuk dan melindungi bakteri (Ajizah et al. 2007). Tabel 1 menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun senggani memiliki aktivitas penghambatan yang tergolong sedang hingga kuat terhadap pertumbuhan *S. aureus* dan *Sa. typhimurium*. Oleh karena itu, daun senggani diteliti lebih lanjut dengan memisahkan ekstrak metanol menjadi dua bagian dengan cara partisi. Pemisahan ini bertujuan untuk memperoleh senyawa antimikroba daun senggani yang lebih sederhana.

Partisi dan uji antimikroba hasil partisi

Proses partisi yang dilakukan merupakan partisi padat-cair, yaitu pemisahan senyawa berdasarkan kemampuan kelarutannya dalam suatu pelarut, sehingga dihasilkan bagian yang larut dan tidak larut pada pelarut yang digunakan. Partisi dilakukan dengan menggunakan alat sentrifugasi, dengan pelarut berupa eter. Eter memiliki indeks kepolaran 2,8 di bawah indeks kepolaran metanol yaitu 5,1 sehingga dengan perbedaan tingkat kepolaran diantara keduanya diharapkan partisi dengan eter ini dapat memisahkan senyawa yang bersifat semipolar agar masuk dalam bagian larut eter sedangkan senyawa-senyawa yang bersifat lebih polar masuk dalam bagian tidak larut eter.

Kromatogram menunjukkan bahwa partisi dengan eter dapat memisahkan ekstrak metanol menjadi dua bagian

yang tidak saling tumpang tindih, dimana bagian larut eter kurang dapat terelusi dibandingkan bagian tidak larut eter dengan fase gerak kloroform: etil asetat (1:9 v/v). Deteksi dengan UV254 menunjukkan bahwa adanya peredaman dengan latar belakang fluoresensi hijau yang mengindikasikan adanya senyawa ikatan rangkap. Kromatogram juga menunjukkan bahwa bagian yang larut eter memiliki satu bercak dengan nilai R_f 0,97 sedangkan pada bagian yang tidak larut eter memiliki sekitar empat bercak dengan nilai R_f 0,10; 0,17; 0,65 dan 0,92. Hasil dari proses partisi didapatkan sebanyak 3,75 g bagian yang larut eter dan 105,2 g bagian yang tidak larut eter. Kedua bagian tersebut kemudian diuji aktivitasnya penghambatannya terhadap pertumbuhan *S. aureus* dan *Sa. typhimurium*.

Uji antimikroba hasil partisi terhadap pertumbuhan bakteri menggunakan metode difusi sumuran (*well diffusion method*) Kirby-Bauer (1966). Bagian larut dan tidak larut eter masing-masing diujikan pada *S. aureus* dan *Sa. typhimurium* dengan konsentrasi 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 dan 1000 mg/mL. Sebagai kontrol digunakan eter, metanol, CMC (1 mg/mL) dan amoksisilin (2,5 mg/mL). Hasil pengujian menunjukkan bahwa bagian larut dan tidak larut eter memiliki aktivitas penghambatan terhadap *S. aureus* maupun *Sa. typhimurium*.

Hasil pengukuran diameter zona hambat (Tabel 2) menunjukkan bahwa bagian larut eter maupun tidak larut eter memiliki aktivitas penghambatan yang tergolong sedang hingga kuat terhadap pertumbuhan *S. aureus* dan *Sa. typhimurium*. Aktivitas penghambatan terbesar ditunjukkan bagian tidak larut eter konsentrasi 900 mg/mL terhadap *S. aureus* dengan diameter zona hambat sebesar 17,15 mm. Sedangkan pada *Sa. typhimurium*, diameter zona hambat terbesar ditunjukkan pada bagian larut eter konsentrasi 700 mg/mL, yaitu sebesar 14, 53 mm. Pengukuran zona hambat hasil partisi larut eter dari ekstrak metanol daun senggani terhadap *S. aureus* dan *Sa. typhimurium* seperti ditunjukkan pada Tabel 2. Gambar 3 menunjukkan diameter zona hambat terbesar dari *S. aureus* dan *Sa. typhimurium*.

Tabel 2 juga menunjukkan bahwa pada konsentrasi yang sama, bagian tidak larut eter memiliki aktivitas penghambatan yang lebih kuat terhadap *S. aureus* dibandingkan dengan bagian larut eter. Sebaliknya, bagian larut eter memiliki aktivitas penghambatan yang lebih kuat terhadap *Sa. typhimurium* dibandingkan dengan bagian tidak larut eter. Hal ini mengindikasikan bahwa *Sa. typhimurium* lebih sensitif terhadap senyawa-senyawa yang bersifat semipolar, sedangkan *S. aureus* lebih sensitif terhadap senyawa-senyawa yang bersifat polar dari daun senggani. Hasil pengukuran menunjukkan bahwa pada konsentrasi yang sama, diameter zona hambat bagian tidak larut eter terhadap *S. aureus* lebih besar yaitu mencapai 17,15 mm pada konsentrasi 900 mg/mL, dibandingkan dengan diameter zona hambat bagian larut eter terhadap *Sa. typhimurium* yang diameter zona hambat terbesarnya hanya mencapai 14,53 mm pada konsentrasi 900 mg/mL. Selain itu, jumlah rendemen bagian tidak larut eter yang dihasilkan juga jauh lebih besar, yaitu sebanyak 105,20 g (96,56 %), dibandingkan dengan bagian larut eter yang hanya mencapai 3,75 g (3,44 %). Bagian tidak larut eter

kemudian dipilih untuk diteruskan ujinya ke tahap selanjutnya, yaitu fraksinasi dengan metode VLC.

Fraksinasi dan uji antimikroba hasil fraksinasi

Fraksinasi dilakukan dengan menggunakan metode VLC terhadap bagian tidak larut eter. Fraksinasi dilakukan dengan fase gerak bertingkat dari pelarut yang kurang polar ke pelarut yang lebih polar sehingga didapatkan sebelas fraksi. Kandungan kimia dari kesebelas fraksi yang dihasilkan kemudian dipantau menggunakan KLT dengan fase gerak metanol: etil asetat (1:7 v/v). Profil kromatografi hasil fraksinasi ditunjukkan pada Gambar 4.

Fraksi yang memiliki persamaan bercak dan nilai R_f digabungkan menjadi satu karena memiliki kandungan kimia yang sama. Enam fraksi gabungan dihasilkan dari tahap fraksinasi dengan menggunakan perbandingan pelarut seperti yang tersaji pada Tabel 3

Enam fraksi tersebut kemudian dipantau profil kandungan senyawa kimianya menggunakan KLT dengan fase gerak metanol: etil asetat (1:7 v/v). Deteksi dengan UV254 menunjukkan adanya peredaman dengan latar belakang fluoresensi hijau yang mengindikasikan adanya senyawa dengan minimal dua ikatan rangkap. Deteksi dengan UV366 menunjukkan adanya pendaran bercak berwarna merah lembayung, mengindikasikan adanya senyawa rangkap terkonjugasi (Harborne 2006). Kromatogramnya seperti tampak pada Gambar 5.

Tabel 2 menunjukkan bahwa pada konsentrasi 300 mg/mL bagian tidak larut eter memiliki diameter zona hambat yang lebih besar dari 10 mm. Sesuai dengan yang dikemukakan oleh Davis dan Stout (1971), hal ini berarti bahwa bagian tidak larut eter memiliki aktivitas penghambatan yang tergolong kuat, baik terhadap *S. aureus* maupun *Sa. typhimurium*. Oleh karena itu, enam fraksi yang didapatkan kemudian diujikan terhadap *S. aureus* dan *Sa. typhimurium* dengan menggunakan metode Kirby-Bauer (1966) dengan konsentrasi 300 mg/mL. Hasil pengukuran diameter zona hambat yang terbentuk seperti tersaji pada Tabel 4.

Tabel 4 menunjukkan bahwa *S. aureus* sensitif terhadap hampir semua fraksi kecuali F1, dengan sensitivitas terbesar ditunjukkan terhadap F6 dengan diameter zona hambat 14,17 mm. Berbeda dengan sensitivitas *Sa. typhimurium*, semua fraksi yang diujikan menunjukkan adanya zona hambat dengan diameter zona hambat terbesar terhadap F5 dengan diameter zona hambat sebesar 13,07 mm. Aktivitas penghambatan yang ditunjukkan F1 terhadap *Sa. typhimurium* tidak terdapat pada *S. aureus*. Sesuai dengan hasil uji difusi sebelumnya (Tabel 2), hal ini diduga disebabkan karena pada F1 masih terdapat senyawa-senyawa yang bersifat semipolar, dimana *Sa. typhimurium* lebih sensitif terhadap senyawa kimia dalam daun senggani yang bersifat semipolar. Fraksi 5 dan F6 dipilih untuk selanjutnya dilakukan uji penetapan nilai MIC dan MBC terhadap *S. aureus* dan *Sa. typhimurium*.

Uji MIC dan MBC fraksi teraktif

Pelczar dan Chan (1988) menyatakan bahwa pertumbuhan bakteri dan mikroorganisme lain merupakan perubahan di dalam hasil panen sel (penambahan total

massa sel) dan bukan perubahan individu organisme. Pertumbuhan menyatakan pertambahan jumlah atau massa melebihi yang ada di dalam inokulum asalnya. Pengukuran diameter zona hambat pada uji difusi hasil fraksinasi (Tabel 4) menunjukkan bahwa F6 memiliki aktivitas penghambatan terbesar terhadap pertumbuhan *S. aureus*, sedangkan F5 memiliki aktivitas penghambatan terbesar terhadap pertumbuhan *Sa. typhimurium*. Aktivitas penghambatan tersebut dapat berupa bakteristatik maupun bakterisidal. Menurut Jawetz et al. (2001) dan Mycek et al. (2001), bakteristatik merupakan kemampuan suatu senyawa untuk dapat menghambat pertumbuhan bakteri, dimana bakteri akan mampu melakukan pertumbuhan kembali jika senyawa tersebut dihilangkan. Bakteri akan terhambat pertumbuhannya selama senyawa tersebut masih ada. Bakterisidal merupakan kemampuan suatu senyawa untuk dapat menghambat pertumbuhan bakteri, dimana bakteri tetap tidak akan memiliki kemampuan untuk melakukan pertumbuhan kembali walaupun senyawa tersebut telah dihilangkan.

Uji MIC dan MBC dilakukan untuk mengetahui apakah senyawa antimikroba pada F5 dan F6 bersifat bakteristatik atau bakterisidal, serta menentukan nilai MIC dan MBC dari F5 terhadap *Sa. typhimurium* dan F6 terhadap *S. aureus*. Penetapan nilai MIC dan MBC penting dilakukan sebagai patokan untuk pemilihan konsentrasi yang tepat dan efektif bagi senyawa yang akan digunakan untuk keperluan pengobatan (Lim et al. 2006).

Uji MIC dan MBC dilakukan pada konsentrasi 100-500 mg/mL. Hasil pengukuran absorbansi pada uji MIC dan MBC F5 terhadap *Sa. typhimurium* seperti tersaji pada Tabel 5. Hasil pengukuran absorbansi (Tabel 5) menunjukkan bahwa F5 pada konsentrasi 100-500 mg/mL menunjukkan nilai ΔOD positif. Hal ini berarti bahwa masih terdapat pertumbuhan bakteri setelah inkubasi, bahkan pada F5 pada konsentrasi 500 mg/mL. Oleh karena itu, pada penelitian ini nilai MIC dan MBC F5 dari ekstrak metanol daun senggani terhadap *S. aureus* tidak dapat ditetapkan.

Hasil pengukuran absorbansi pada uji MIC dan MBC F6 terhadap *S. aureus* seperti tersaji pada Tabel 6. Hasil pengukuran absorbansi menunjukkan bahwa setelah dilakukan inkubasi selama 24 jam, pada konsentrasi 100-300 mg/mL nilai ΔOD positif. Hal ini berarti bahwa pada tersebut masih terdapat pertumbuhan *S. aureus*. Sebaliknya, hasil pengukuran absorbansi pada konsentrasi 400 dan 500 mg/mL menunjukkan bahwa nilai ΔOD negatif (dalam hal ini dianggap nol), yang berarti bahwa pertumbuhan *S. aureus* tidak terjadi. Oleh karena itu, dapat ditetapkan bahwa nilai MIC F6 terhadap *S. aureus* sebesar 400 mg/mL. Berikutnya dilakukan uji lanjut untuk menetapkan nilai MBC F6 terhadap *S. aureus*.

Uji lanjut dilakukan dengan mensubkultur bakteri dalam tabung konsentrasi 400 dan 500 mg/mL pada media MHA selama 24 jam. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa bakteri yang diambil dari konsentrasi 400 maupun 500 mg/mL masih menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri. Hal ini berarti bahwa F6 pada konsentrasi 400 dan 500 mg/mL bersifat bakteristatik terhadap *S. aureus*, sehingga nilai MBC tidak dapat ditetapkan.

Tabel 1. Hasil pengukuran zona hambat ekstrak metanol daun senggani terhadap pertumbuhan *S. aureus* dan *Sa. typhimurium*

Sampel yang diuji	Konsentrasi (mg/mL)	Diameter zona hambat (mm)	
		<i>S. aureus</i>	<i>Sa. typhimurium</i>
Ekstrak metanol	100	7,985	5,600
daun senggani	200	10,600	8,730
	300	10,735	9,635
	400	11,435	12,700
	500	12,350	12,665
	600	13,065	13,930
	700	12,715	10,685
	800	12,835	13,085
	900	13,835*	14,615*
	1000	13,320	13,500
Kontrol methanol		0,000	0,000
Kontrol CMC (1 mg/mL)		0,000	0,000
Kontrol amoksisilin (2,5 mg/mL)		5,400	12,030

Keterangan: *diameter zona hambat terbesar

Tabel 2. Hasil pengukuran zona hambat hasil partisi dari ekstrak metanol daun senggani terhadap *S. aureus* dan *Sa. typhimurium*

Sampel yang diuji		Diameter zona hambat (mm)			
		<i>S.aureus</i>		<i>Sa. typhimurium</i>	
		L	TL	L	TL
Hasil partisi (mg/mL)	100	5,65	9,70	10,27	6,85
	200	8,00	11,58	10,88	10,42
	300	9,42	15,35	14,17	11,68
	400	10,67	14,75	13,95	12,45
	500	11,18	14,17	11,55	12,40
	600	11,49	15,22	11,44	13,03
	700	13,02	16,07	14,53*	12,94
	800	12,72	16,48	13,35	14,04*
	900	13,10*	17,15*	14,30	13,32
	1000	12,27	16,59	12,62	13,32
Kontrol eter		0,00		0,00	
Kontrol metanol		0,00		0,00	
Kontrol CMC (1 mg/mL)		0,00		0,00	
Kontrol amoksisilin (2,5 mg/mL)		8,43		25,60	

Keterangan: L: bagian larut eter, TL: bagian tidak larut eter, *: diameter zona hambat terbesar

Tabel 3. Fraksi gabungan bagian tidak larut eter dari ekstrak metanol daun senggani

Perbandingan pelarut	Fraksi ke-	Massa total fraksi (g)
CHCl ₃ 100%		
CHCl ₃ : EtoAc (2:1 v/v)	1	0,461
CHCl ₃ : EtoAc (1:1 v/v)		
CHCl ₃ : EtoAc (1:3 v/v)	2	0,594
CHCl ₃ : EtoAc (1:5 v/v)	3	0,290
CHCl ₃ : EtoAc (1:9 v/v)		
CHCl ₃ : EtoAc (1:15 v/v)		
CHCl ₃ : MeOH (1:1 v/v)	4	0,357
CHCl ₃ : MeOH (2:1 v/v)		
CHCl ₃ : MeOH (3:1 v/v)		
CHCl ₃ : MeOH (6:1 v/v)	5	8,870
MeOH 100%	6	2,628

Tabel 4. Hasil pengukuran zona hambat fraksi daun senggani terhadap *S. aureus* dan *Sa. typhimurium* pada konsentrasi 300 mg/mL

Sampel yang diuji	Diameter zona hambat (mm)	
	<i>S. aureus</i>	<i>Sa. typhimurium</i>
F1	0,00	1,27
F2	5,19	7,82
F3	8,85	3,02
F4	8,00	8,42
F5	9,59	13,07*
F6	14,17*	9,77
Kontrol eter	0,00	0,00
Kontrol metanol	0,00	0,00
Kontrol CMC (1 mg/mL)	0,00	0,00
Kontrol amoksisilin (2,5 mg/mL)	14,07	13,03

Keterangan: *: diameter zona hambat terbesar

Tabel 5. Hasil pengukuran absorbansi pada uji MIC dan MBC F5 terhadap *Sa. typhimurium*

Fraksi 5 (mg/mL)	OD1	OD2	ΔOD	Pertumbuhan bakteri		Aktivitas
				Setelah inkubasi	Uji lanjut	
100	0,2932	1,5120	1,2188	Tumbuh	-	-
200	0,9045	2,3118	1,4073	Tumbuh	-	-
300	1,0585	2,7372	1,6787	Tumbuh	-	-
400	2,1279	2,9597	0,8318	Tumbuh	-	-
500	2,7668	3,3113	0,5445	Tumbuh	-	-

Keterangan: OD1: optical density sebelum inkubasi OD2: optical density setelah inkubasi, ΔOD: selisih nilai OD1 dan OD2, -: tidak ada

Tabel 6. Hasil pengukuran absorbansi pada uji MIC dan MBC F6 terhadap *S. aureus*

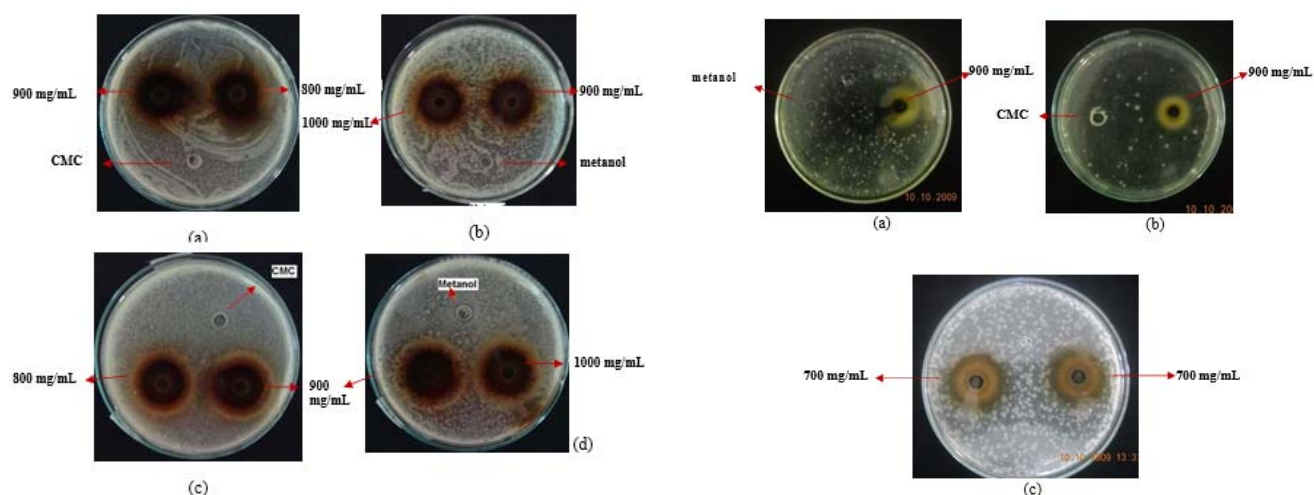
Fraksi 6 (mg/mL)	OD1	OD2	ΔOD	Pertumbuhan bakteri		Aktivitas
				Setelah inkubasi	Uji lanjut	
100	0,29321	3,0681	0,136	Tumbuh	-	-
200	0,90451	5,6270	6,582	Tumbuh	-	-
300	1,05851	6,0990	5,514	Tumbuh	-	-
400	2,12792	0,8760		Tidak tumbuh	Tumbuh	Bakteriostatik
500	2,76682	1,3510		Tidak tumbuh	Tumbuh	Bakteriostatik

Keterangan: OD1: optical density sebelum inkubasi OD2: optical density setelah inkubasi, ΔOD: selisih nilai OD1 dan OD2, -: tidak ada

Tabel 7. Hasil uji golongan senyawa kimia pada F5 dan F6

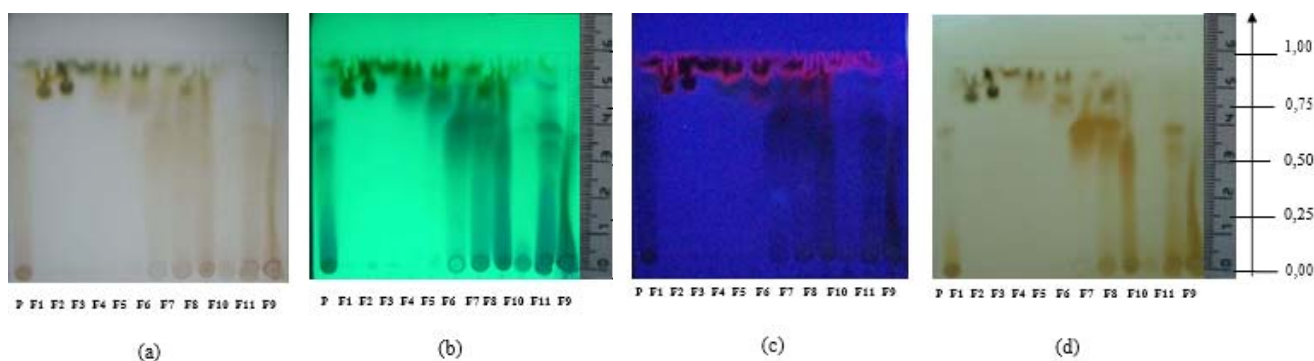
Fraksi yang diuji	Pereaksi semprot spesifik					
	FeCl ₃	AlCl ₃	Vanilin H ₂ SO ₄	SbCl ₃	Lieberman Burchad	Serium (IV) sulfat
F5	+	-	-	-	-	+
F6	+	-	-	-	-	+

Keterangan: +: hasil positif, -: hasil negatif

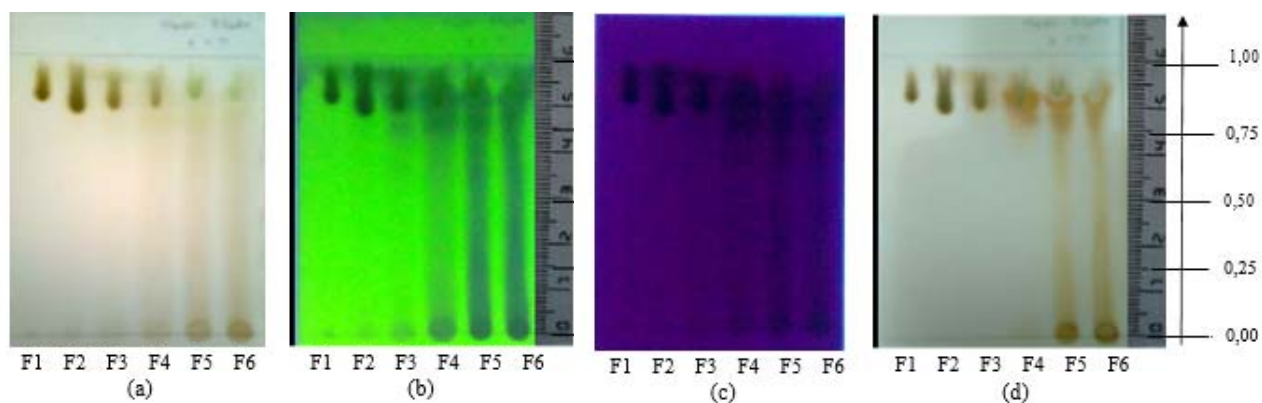


Gambar 1. Hasil uji antimikroba (a) ekstrak metanol konsentrasi 800 dan 900 mg/mL terhadap *S. aureus*, (b) ekstrak metanol konsentrasi 900 dan 1000 mg/mL terhadap *S. aureus*, (c) ekstrak metanol konsentrasi 800 dan 900 mg/mL terhadap *Sa. typhimurium* dan (d) ekstrak metanol konsentrasi 900 dan 1000 mg/mL terhadap *Sa. typhimurium*

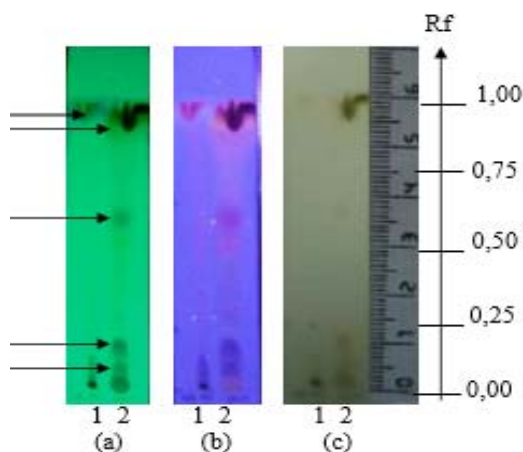
Gambar 3. Hasil uji antimikroba (a) bagian tidak larut eter konsentrasi 900 mg/mL dan kontrol metanol terhadap *S. aureus* (b) bagian tidak larut eter konsentrasi 900 mg/mL dan kontrol CMC (1 mg/mL) terhadap *S. aureus*, dan (c) bagian larut eter 700 mg/mL terhadap *Sa. typhimurium*.



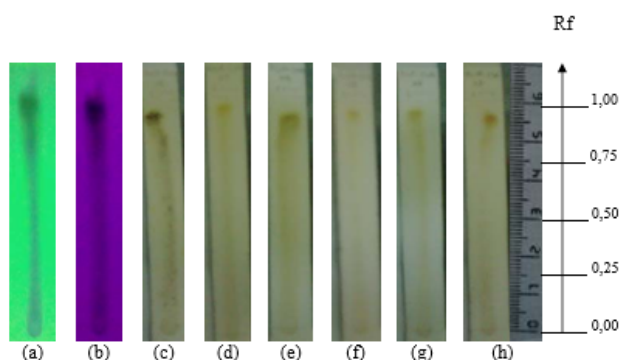
Gambar 4. Kromatogram fraksi daun senggani dengan deteksi (a) sinar visibel, (b) UV254, (c) UV366, dan (d) serum (IV) sulfat. Fase diam: silika gel GF254, Fase gerak: kloroform:etil asetat 1:9 (v/v), Jarak pengembangan: 6 cm



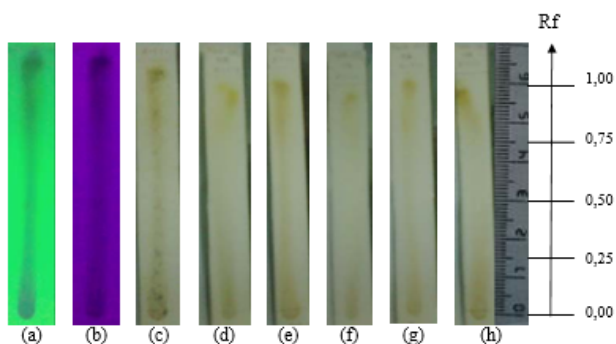
Gambar 5. Kromatogram enam fraksi daun senggani dengan deteksi (a) sinar visibel, (b) V254, (c) UV366, dan (d) serum (IV) sulfat. Fase diam: silika gel GF254, Fase gerak: kloroform:etil asetat 1:9 (v/v), Jarak pengembangan: 6 cm



Gambar 2. Kromatogram bagian larut dan tidak larut eter dengan deteksi (a) UV254 (b) UV366 (c) serum (IV) sulfat. Fase diam: silika gel GF254, Fase gerak: kloroform:etil asetat 1:9 (v/v), Jarak pengembangan: 6 cm, Keterangan: 1. Larut eter dan 2. Tidak larut eter



Gambar 6. Kromatogram F5 dengan deteksi (a) UV254, (b) UV 366, (c) FeCl_3 , (d) AlCl_3 , (e) Vanilin H_2SO_4 , (f) SbCl_3 , (g) Lieberman- Burchad dan (h) serum (IV) sulfat. Fase diam: silika gel GF254, Fase gerak: metanol:etil asetat: wasbensin = 2:1:1 (v/v), Jarak pengembangan: 6 cm



Gambar 7. Kromatogram F6 dengan deteksi (a) UV254, (b) UV 366, (c) FeCl_3 , (d) AlCl_3 , (e) Vanilin H_2SO_4 , (f) SbCl_3 , (g) Lieberman-Burchad dan (h) serum (IV) sulfat. Fase diam: silika gel GF254, Fase gerak: metanol:etil asetat: wasbensin = 2:1:1 (v/v), Jarak pengembangan: 6 cm

Deteksi golongan senyawa fraksi teraktif

Deteksi golongan senyawa dilakukan terhadap F5 dan F6 dari ekstrak metanol daun senggani. Deteksi golongan senyawa dilakukan dengan KLT, dengan fase gerak metanol: etil asetat: wasbensin (2:1:1 v/v) untuk F5 dan metanol: kloroform: wasbensin (2:1:1 v/v) untuk F6. Pengamatan yang dilakukan pada UV254 dan UV366 belum memberikan informasi yang lengkap, terutama untuk mengetahui keberadaan senyawa yang tidak dapat berpendar. Oleh karena itu untuk memperoleh informasi keberadaan senyawa yang tidak dapat berpendar, pengamatan dilakukan dengan memberikan pereaksi semprot pada lempeng KLT tersebut.

Pereaksi semprot yang digunakan yaitu FeCl_3 untuk mendeteksi adanya senyawa tanin dan fenolat, AlCl_3 untuk mendeteksi adanya senyawa flavonoid, vanilin asam sulfat untuk mendeteksi adanya senyawa terpenoid, SbCl_3 untuk mendeteksi adanya senyawa saponin, Lieberman-Burchad untuk mendeteksi adanya senyawa steroid dan terpenoid, serta serum (IV) sulfat untuk mendeteksi adanya senyawa organik (Santosa dan Hertiani 2005, Harborne 2006, Permana 2009). Hasil uji golongan senyawa kimia pada F5 dan F6 seperti tersaji pada Tabel 7.

Pereaksi semprot AlCl_3 digunakan untuk mendeteksi adanya senyawa flavonoid. Sampel dikatakan positif mengandung senyawa golongan flavonoid jika terbentuk fluoresensi hijau kuning dengan sinar UV366 setelah penyemprotan (Harborne 2006). Deteksi dengan AlCl_3 menunjukkan hasil negatif yang mengindikasikan bahwa baik F5 dan F6 tidak mengandung senyawa golongan flavonoid.

Pereaksi semprot vanilin asam sulfat digunakan untuk mendeteksi adanya senyawa terpenoid. Sampel dikatakan positif mengandung senyawa golongan terpenoid jika terbentuk warna ungu, biru, biru-ungu, atau orange ke merah ungu setelah dilakukan penyemprotan (Harborne 2006). Deteksi dengan vanillin asam sulfat menunjukkan hasil negatif yang mengindikasikan bahwa baik F5 dan F6 tidak mengandung senyawa golongan terpenoid.

Pereaksi semprot SbCl_3 digunakan untuk mendeteksi adanya senyawa saponin. Sampel dikatakan positif mengandung saponin jika terbentuk warna merah violet setelah disemprot dengan SbCl_3 (Santosa dan Hertiani 2005). Deteksi dengan SbCl_3 menunjukkan hasil negatif yang mengindikasikan bahwa F5 dan F6 tidak mengandung senyawa golongan saponin.

Lieberman-Burchad digunakan untuk mendeteksi adanya senyawa steroid dan terpenoid. Sampel dikatakan positif mengandung steroid jika terbentuk warna biru dan dinyatakan positif mengandung terpenoid jika terbentuk warna merah (Permana 2009). Deteksi dengan Lieberman-Burchad menunjukkan hasil negatif yang mengindikasikan bahwa F5 dan F6 tidak mengandung senyawa golongan steroid dan terpenoid.

Kromatogram (Gambar 6) menunjukkan bahwa uji golongan senyawa kimia terhadap F5 menunjukkan hasil negatif terhadap semua pereaksi spesifik yang diujikan kecuali FeCl_3 dan serum (IV) sulfat. Fraksi 5 menunjukkan adanya reaksi positif terhadap reagen FeCl_3 dengan terbentuk warna biru-kehitaman. Deteksi dengan

sinar UV254 menunjukkan adanya peredaman dengan latar belakang fluoresensi hijau, sedangkan deteksi dengan sinar UV366 menunjukkan adanya pendaran berwarna merah lembayung dengan harga Rf 0,94.

Kromatogram F6 seperti tampak pada Gambar 7. Seperti pada F5, kromatogram (Gambar 7) menunjukkan bahwa uji golongan senyawa kimia terhadap F6 menunjukkan hasil negatif terhadap semua pereaksi spesifik yang diujikan kecuali FeCl_3 dan serum (IV) sulfat. Fraksi 6 menunjukkan adanya reaksi positif terhadap reagen FeCl_3 dengan terbentuk warna biru-kehitaman. Deteksi dengan sinar UV254 menunjukkan adanya peredaman dengan latar belakang fluoresensi hijau, sedangkan deteksi dengan sinar UV366 menunjukkan adanya pendaran berwarna merah lembayung dengan harga Rf 0,94.

Menurut Syarifuddin (1994), perubahan warna yang terjadi pada penambahan FeCl_3 dimungkinkan karena terbentuknya kompleks Fe^{3+} -tanin atau Fe^{3+} -polifenol. Atom oksigen pada tanin dan polifenol mempunyai pasangan elektron bebas yang dapat mendonorkan elektronnya pada Fe^{3+} yang mempunyai orbital d kosong membentuk ikatan kovalen koordinat sehingga menjadi suatu kompleks. Kompleks ini akan menimbulkan warna hijau, merah, biru atau hitam yang kuat apabila mengandung senyawa fenolat.

Menurut Jawetz et al. (2001), senyawa fenol dan derivatnya mampu menimbulkan denaturasi protein. Fenol berikatan dengan protein melalui ikatan hidrogen sehingga mengakibatkan struktur protein menjadi rusak. Sebagian besar struktur dinding sel dan membran sitoplasma bakteri mengandung protein dan lemak. Ketidakstabilan pada dinding sel dan membran sitoplasma bakteri menyebabkan fungsi permeabilitas selektif, fungsi pengangkutan aktif, pengendalian susunan protein dari sel bakteri menjadi terganggu. Gangguan integritas sitoplasma berakibat pada lolosnya makromolekul, dan ion dari sel. Sel bakteri menjadi kehilangan bentuknya, dan terjadilah lisis.

Tanin terhidrolisis akan menunjukkan warna biru-hitam sedangkan tanin terkondensasi akan membentuk warna biru-hijau setelah penyempitan FeCl_3 pada plat KLT (Permana 2009). Warna biru kehitaman yang terbentuk mengindikasikan bahwa tanin yang terdapat pada F5 maupun F6 daun senggani adalah tanin terhidrolisis. Hal ini seperti yang telah dilaporkan Funatogawa et al. (2004) yang menyatakan bahwa daun senggani memiliki kandungan tanin terhidrolisis yang disebut sebagai Susanti et al. (2008) memaparkan bahwa selain nobotanin B, kandungan senyawa golongan tanin terhidrolisis yang terdapat pada daun senggani antara lain malabathrin B, malabathrin C, malabathrin D, 1,4,6-tri-O-galloyl-D-glukosida, 1,2,4,6-tetra-O-galloyl- β -D-glukosida, strictinin, casuarictin, pedunculagin, nobotanin D, pterocaritin, nobotanin G, nobotanin H, nobotanin J, β -sitosterol, α -amyrin, uvaol, sitosterol-3-O- β -D-glukopiranosid, quercetin, quercitrin dan rutin.

Penelitian yang dilakukan oleh Funatogawa et al. (2004) melaporkan bahwa Senggani merupakan salah satu tumbuhan obat penghasil tanin terhidrolisis, yaitu nobotanin B, yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap

Helicobacter pylori. Lim et al. (2006) memaparkan bahwa tanin terhidrolisis yang diekstrak dari *Rhizophora apiculata* memiliki sifat antimikroba yang lebih besar terhadap bakteri dan yeast daripada tanin terkondensasi maupun campuran keduanya (tanin terhidrolisis dan tanin terkondensasi). Selain pengujian kualitatif berdasarkan KLT, pengujian adanya tanin dapat dilakukan dengan uji tabung menggunakan larutan garam gelatin dan FeCl_3 sehingga diharapkan dengan adanya pengujian ini dapat memastikan bahwa tanin yang terkandung pada F5 dan F6 merupakan tanin terhidrolisis atau tanin terkondensasi.

Tanin mempunyai sifat sebagai pengelat, yang mampu mengerutkan selaput lendir usus sehingga gerak peristaltik usus berkurang (Ajizah 2004). Selain itu, zat pengelat juga dapat mengerutkan membran sel sehingga mengganggu permeabilitas sel itu sendiri. Lim et al. (2006) memaparkan bahwa tanin terhidrolisis mampu menghambat pertumbuhan yeast dengan menghambat sintesis pembentukan membran sel dari dinding sel. Abnormalitas yang terjadi pada membran sel ini kemudian menyebabkan perubahan pada permeabilitas sel. Terganggunya permeabilitas membran sel menyebabkan terganggunya transport nutrisi (senyawa dan ion) melalui membran sel sehingga sel bakteri mengalami kekurangan nutrisi yang diperlukan bagi pertumbuhannya. Sebagai akibatnya, sel tidak dapat melakukan aktivitas hidup sehingga pertumbuhannya terhambat atau bahkan mati. Selain melalui reaksi dengan membran sel, efek antimikroba tanin juga melalui inaktivasi enzim dan destruksi atau inaktivasi fungsi materi genetik (Ajizah 2004). Kemungkinan mekanisme inilah yang menyebabkan efek antimikroba yang ditimbulkan oleh daun senggani terhadap *S. aureus* dan *Sa. typhimurium*.

Hasil metabolit sekunder yang diisolasi dari daun senggani diketahui memiliki aktivitas yang signifikan dalam memproteksi jaringan mukosa pada tikus putih, memiliki aktivitas antiviral, antihelmintik, antispasmodik, antioksidan, antifungal, antikanker, antihipertensi (Hussain et al. 2008), antiinflamatori, antinoseptik, dan antipiretik (Zakaria et al. 2007, Mazura et al. 2007), memiliki aktivitas antifungal terhadap berbagai fungi patogen seperti *Alternaria alternata*, *Curvularia lunata*, *Fusarium equiseti*, *Botrydiplodia theobromae* dan *Colletotrichum corchori* (Begum et al. 2007) serta kandungan fenolnya memiliki aktivitas alelopati terhadap *Raphanus sativus* dan *Echinochloa crus galli* (Faravani et al. 2008). Ekstrak metanol 70% dari daun senggani juga memiliki aktivitas penghambatan terhadap sintesis nitrit oksida yang berperan terhadap proses inflamasi (Ryu et al. 2001). Antosianin yang diekstrak dari bunga Senggani, yaitu sianidin, memiliki aktivitas antioksidan, antikarsinogenik, antibakteri, antiviral serta banyak digunakan sebagai pewarna alami (See 2008).

KESIMPULAN

Komponen senyawa daun senggani memiliki aktivitas antimikroba teraktif terhadap *S. aureus* pada fraksi 6 konsentrasi 300 mg/mL dengan diameter zona hambat

sebesar 14,17 mm dan terhadap *Sa. typhimurium* pada fraksi 5 konsentrasi 300 mg/mL dengan diameter zona hambat sebesar 13,07 mm. Nilai MIC fraksi 6 terhadap *S. aureus* adalah 400 mg/mL dengan nilai MBC tidak dapat ditentukan, sedangkan nilai MIC dan MBC fraksi 5 terhadap *Sa. typhimurium* juga tidak dapat ditentukan. Komponen senyawa daun senggani yang berperan sebagai antimikroba termasuk dalam golongan fenolik, yaitu tanin dengan harga Rf 0,94.

DAFTAR PUSTAKA

- Ajizah A. 2004. Sensitivitas *Salmonella typhimurium* terhadap Ekstrak Daun *Psidium guajava* L. Bioscientiae 1 (1): 31-38.
- Ajizah A, Thihana, Mirhanuddin. 2007. Potensi Ekstrak Kayu Ulin (*Eusideroxylon zwageri*) dalam Menghambat Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* secara in vitro. Bioscientiae 4 (1): 37-42.
- Begum J, Yusuf M, Chowdhury JU, Khan S, Anwar MN. 2007. Antifungal activity of forty higher plants against phytopathogenic fungi. Bang J Microbiol 24 (1): 76-78.
- Davis WW, TR Stout. 1971. Disc plate methode of microbiological antibiotic assay. Microbiol 22: 659-665.
- Depkes RI. 1995a. Materi Medika Indonesia edisi VI. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan Departemen Kesehatan RI, Jakarta.
- Depkes RI. 1995b. Farmakope Indonesia edisi IV. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan Departemen Kesehatan RI, Jakarta.
- Depkes RI. 2000. Parameter Umum Standar Ekstrak Tumbuhan Obat Cetakan Pertama. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan Departemen Kesehatan RI, Jakarta.
- Dwidjoseputro D. 1994. Dasar-dasar Mikrobiologi. Djambatan, Jakarta.
- Faravani M, Baki HB, Khalijah A. 2008. Assessment of allelopathic potential of *Melastoma malabathricum* on Radish *Raphanus sativus* and Barnyard Grass *Echinochloa crus-galli*. Not Bot Hort Agrobot Cluj 36 (2):54-60.
- Funatogawa K, Hayashi S, Shimomura H, Yoshida T, Hatano T, Ito H, Hirai Y. 2004. Antibacterial activity of hydrolyzable tannins from medicinal plants against *Helicobacter pylori*. Microbiol Immunol 48 (4), 251-261.
- Hadinegoro SR. 1999. Masalah Multi Drug Resistance pada Demam Tifoid. CDK 124: 5-8.
- Handayani D, Sayuti N, Dachriyanus. 2008. Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Antibakteri Epidioksi Sterol dari Spon Laut *Petrosia nigrans* Asal Sumatera Barat. Prosiding Seminar Nasional Sains dan Teknologi-II: 297-305
- Harbone JB. 2006. Metode Fitokimia Cetakan Keempat Diterjemahkan oleh Kokasih Padmawinata, Iwang Sudiro. Terbitan II. Penerbit ITB, Bandung.
- Hariamana A. 2008. Tumbuhan Obat dan Khasiatnya. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Hussain F, Abdulla MA, Noor SM, Ismail S, Ali HM. 2008. Gastroprotective effects of *Melastoma malabathricum* aqueous leaf extract against ethanol-induced gastric ulcer in rats. Am J Biochem Biotech 4 (4): 438-441.
- Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. 2001. Mikrobiologi untuk Profesi Kesehatan (Review of Medical Mikrobiology) Diterjemahkan oleh Tomang H. Penerbit EGC, Jakarta.
- Kusmiyati NWS, Agustini. 2007. Uji Aktivitas Senyawa Antibakteri dari Mikroalga *Porphyridium cruentum*. Biodiversitas 8 (1): 48-53.
- Lim SH, Darah I, Jain K. 2006. Antimicrobial of tannins extracted from *Rhizophora apiculata* Barks. J Trop For Sci 18 (1): 59-65.
- Mazura MP, Susanti D, Radasah MA. 2007. Anti-inflammatory action of components from *Melastoma malabathricum*. Pharmacol Biol 45 (5): 372-375.
- Mojab F, M. Poursaeed, H Mehrgan, S Pakdaman. 2008. Antibacterial activity of *Thymus daenensis* methanolic extract. Pak J Pharm Sci 21 (3): 210-213.
- Morin RB, Gorman M. 1995. Kimia dan Biologi Antibiotik β -Lactam (Chemistry and Biology of β -Lactam Antibiotics). Edisi III. Diterjemahkan oleh Mulyani S. IKIP Semarang Press, Semarang.
- Mutschler E. 1991. Dinamika Obat Edisi 5. Penerbit Institut Teknologi Bandung, Bandung.
- Mycek MJ, Harvey RA, Champe PC, Fisher BD. 2001. Farmakologi Ulasan Bergambar. edisi kedua. Diterjemahkan oleh Agoes A. Penerbit Widya Medika, Jakarta.
- Noor SM, Poeloengan M, Yulianti T. 2006. Analisis senyawa kimia sekunder dan uji daya antibakteri ekstrak daun tanjung (*Mimusops elengi* L) terhadap *Salmonella typhi* dan *Shigella boydii*. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner 2006.
- Pelczar MJ, Chan ECS. 1988. Dasar-dasar Mikrobiologi 2. UI Press, Jakarta.
- Permana AR. 2009. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Buah Pare Belut (*Trichosanthes anguina* L.). [Skripsi]. Universitas Sebelas Maret, Surakarta.
- Purnomo A, Khusnan H, Salasia SIO, Soegiyono. 2006. Isolasi dan karakterisasi *Staphylococcus aureus* asal susu kambing peranakan ettawa. MKH 22 (3): 142-146.
- Purwoko T. 2007. Fisiologi Mikrobial. Bumi Aksara, Jakarta.
- Rahayu WP. 2000. Aktivitas antimikroba bumbu masakan tradisional hasil olahan industri terhadap bakteri patogen dan perusak. Bul Teknol dan Industri Pangan 11 (22): 42-48.
- Retnaningtyas E, Mulyani S. 2008. Uji antibakteri ekstrak metanol daun senggani (*Melastoma candidum*, D. Don) terhadap bakteri *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae* dan *Escherichia coli*. [Laporan Penelitian]. LPPM UNS, Surakarta.
- Ryu JH, Ahn H, Lee HJ, Feng L, Qun WH, Han YN, Han BH. 2001. Inhibitory activity of chinese medical plants of nitric oxide synthesis in lipopolysaccharide-activated macrophages. J Pharmacol 9: 183-187.
- Santosa CM, Hertiani T. 2005. Kandungan senyawa kimia dan efek ekstrak air daun bangun-bangun (*Coleus amboinicus*, L.) pada aktivitas fagositosis netrofil tikus putih (*Rattus norvegicus*). Majalah Farmasi Indonesia 16 (3): 141-148.
- See KS. 2008. Establishment of Cell Suspension Culture of *Melastoma malabathricum* L. for the Production of Anthocyanin. [Thesis]. Universiti Sains Malaysia, Pulau Pinang.
- Sembiring BB, Ma'mun, Ginting EI. 2006. Pengaruh kehalusan bahan dan lama ekstraksi terhadap mutu ekstrak temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb). Bul Littro 17 (2): 53-58.
- Sentra Informasi IPTEK. 2009. Senggani (*Melastoma candidum* D. Don). http://www.iptek.net.id/ind/pd_tanobat/view.php?mnu=2&id=156. [09 April 2009]
- Sjaajurrahman A, Kumala W, Nurjadi T. 1999. Kepekakaan kuman terhadap antibiotika golongan kuinolon dan sefalosporin. CDK 124: 17-20.
- Srijanto B, Rosidah I, Ris E, Syabirin G, Aan, Mahreni. 2004. Pengaruh Waktu, Suhu dan Perbandingan Bahan Baku-Pelarut pada Ekstraksi Kurkumin dari Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) dengan Pelarut Aseton. Prosiding Seminar Nasional Rekayasa Kimia dan Proses: 1-5.
- Susanti D, Sirat HM, Ahmad F, Ali RM. 2008. Bioactive constituents from the leaves *Melastoma malabathricum*. Jurnal Ilmiah Farmasi 5 (1): 1-7.
- Syarifuddin N. 1994. Ikatan Kimia cetakan pertama. Gajah Mada University Press, Yogyakarta.
- Tensiska, Marsetio, Yudiastuti SON. 2007. Pengaruh Jenis Pelarut terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kasar Isoflavon dari Ampas Tahu. Laporan Penelitian. FTIP Universitas Padjadjaran, Bandung.
- Tjay TH, Rahardja K. 2002. Obat-obat Penting Khasiat Penggunaann dan Efek Sampingnya. Edisi Kelima. PT Gramedia, Jakarta.
- Triatmodjo P. 1994. Distribusi geografis pola resistensi salmonella terhadap khloramfenikol dan antibiotik pilihan lainnya di daerah Jakarta dan Palembang. CDK 93: 56-59.
- Wang YC, Hsu HW. 2007. Inhibitory effect of *Melastoma candidum* D. Don acetone extract on foodborne pathogenic bacteria survival in food products. J Food Protection 79 (7): 1600-1606.
- Williams RAD, Lambert PA, Singleton P. 1996. Antimicrobial Drug Action. Information Press Ltd., Oxford.
- Yuharmen, Y Ernayati, Nurbalatif. 2002. Uji Aktivitas Antimikroba Minyak Atsiri dan Ekstrak Metanol Legkuas (*Alpinia galanga*). [Laporan Penelitian]. Jurusan Kimia FMIPA Universitas Riau, Pekanbaru, Riau.
- Zakaria ZA, Noor RNSRM, Kumar GH, Ghani ZDFA, Sulaiman MR, Devi GR, Jais AMM, Somchit MN, Fatimah DA. 2007. Antinociceptive, anti-inflammatory and antipyretic properties of *Melastoma malabathricum* leaves aqueous extract in experimental animals. Can J Physiol Pharmacol 84 (12): 1291-1299.