

## UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI DAN EKSTRAK BUAH BELIMBING WULUH (*Averrhoa bilimbi* L.) TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI *Staphylococcus aureus*

Clarissma Fitri Amelia Male<sup>1\*</sup>, Mamik Ponco Rahayu<sup>2</sup>, Destik Wulandari<sup>3</sup>

<sup>1</sup>S1 Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi Surakarta,  
Jl. Ledjen Sutoyo, Surakarta, Indonesia, 133 201

<sup>2,3</sup>D3 Analis Farmasi dan Makanan, Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi Surakarta, Jl. Ledjen  
Sutoyo, Surakarta, Indonesia, 133 201

Korespondensi: [clarissmafitriameliamale@gmail.com](mailto:clarissmafitriameliamale@gmail.com)

### ABSTRAK

Buah belimbing wuluh memiliki kandungan senyawa pada yaitu flavonoid, tanin, saponin, steroid/triterpenoid dan alkaloid yang berfungsi sebagai antibakteri. Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas antibakteri fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air dari ekstrak etanol buah belimbing wuluh terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; mengetahui fraksi teraktif dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dari buah belimbing wuluh terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Buah belimbing wuluh diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Fraksinasi dari ekstrak buah belimbing wuluh dengan pelarut *n*-heksan, etil asetat dan air. Uji aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi dari ekstrak etanol buah belimbing wuluh terhadap *Staphylococcus aureus* dilakukan dengan metode difusi pada konsentrasi 20%, 10%, dan 5%, sedangkan penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dari fraksi teraktif dengan metode dilusi pada konsentrasi 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,12%; 1,56%; 0,78%; 0,39%. Data diameter zona hambat yang diperoleh dari hasil uji difusi dianalisis statistik menggunakan metode *one way* ANOVA. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak dan fraksi buah belimbing wuluh memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Fraksi etil asetat buah belimbing wuluh dengan konsentrasi 20% memiliki aktivitas antibakteri teraktif dengan rata-rata diameter zona hambat sebesar 26,32 mm. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) fraksi etil asetat terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 sebesar 12,5%.

**Kata kunci:** Antibakteri, Buah Belimbing Wuluh, Ekstraksi, Fraksinasi, *Staphylococcus aureus*

### ABSTRACT

Starfruit contains compounds, namely flavonoids, tannins, saponins, steroids/triterpenoid, and alkaloids that function as antibacterials. This study aims to test the antibacterial activity of the *n*-hexane fraction, ethyl acetate and water from the ethanol extract of star fruit wuluh against the growth of *Staphylococcus aureus* bacteria ATCC 25923; knowing the most active fraction and Minimum Kill Concentration (KBM) of starfruit wuluh against the growth of *Staphylococcus aureus* bacteria ATCC 25923. Starfruit was extracted using the maceration method with 96% ethanol as solvent. Fractionation of star fruit extract with *n*-hexane, ethyl acetate and water as solvents. Antibacterial activity test of extracts and fractions of ethanol extract of starfruit fruit against *Staphylococcus aureus* was carried out by diffusion method at concentrations of 20%, 10%, and 5%, while the determination and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of the most active fraction was carried out by dilution method at concentrations of 50%; 25%; 12.5%; 6.25%; 3.12%; 1.56%; 0.78%; 0.39%. Data on the diameter of the inhibition zone obtained from the results of the diffusion test were statistically analyzed using the *one way* ANOVA method. The results showed that the extract and fraction of starfruit fruit had antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. The ethyl acetate fraction of starfruit fruit with a concentration of 20% had the most active antibacterial activity with an average diameter of the inhibition zone of 26,32 mm. Minimum Kill Concentration (KBM) etil fraction asetat against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 by 12,5%.

**Keywords:** antibacterial, extraction, fractionation, *Staphylococcus aureus*, wuluh starfruit

### PENDAHULUAN

Diperkirakan 85% orang berusia antara 11 dan 30 tahun menderita jerawat, kondisi kulit yang umum terjadi [1]. Di Indonesia, sekitar 80 hingga 85 persen remaja menderita jerawat. Jerawat, sebutan untuk

kondisi ini, sering kali menyerang kulit di bagian punggung, leher, dada, dan wajah. Penumpukan minyak berlebih menyumbat pori-pori dan menyebabkan jerawat ketika kelenjar sebacea (kelenjar minyak) kulit terlalu aktif [2].

*Staphylococcus aureus* merupakan salah satu bakteri penyebab jerawat. *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri koagulase positif, katalase positif, dan gram positif. Menurut perkiraan, 20% orang yang tampak sehat memiliki bakteri ini [3]. Banyak penyakit kulit, termasuk jerawat, keracunan makanan, endokarditis, dan infeksi paru-paru, dapat disebabkan oleh bakteri *Staphylococcus aureus* [4]. Karena kemampuannya menginfeksi setelah operasi, bakteri ini merupakan salah satu bakteri yang selalu menimbulkan kesulitan. Antibiotik dapat digunakan untuk menghentikan perkembangan bakteri ini.

Pengobatan utama untuk infeksi bakteri adalah penggunaan antibiotik. Obat antibakteri untuk jerawat meliputi *clindamycin*, *erythromycin*, *doxycycline*, dan *tetracycline*. Di antara obat-obatan yang dapat digunakan untuk mengobati jerawat adalah benzoin peroksida, retinoid, dan asam azelaic; namun, penggunaan obat-obatan ini secara berlebihan dapat menyebabkan konsekuensi yang merugikan [5]. Efek samping yang dapat disebabkan antara lain iritasi, kemerahan dan kering, eritema dan dermatitis kontak alergi [6].

Banyak penyakit telah lama diobati dengan belimbing sebagai alternatif. Berdasarkan hasil skrining fitokimia, ekstrak metanol belimbing mengandung alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, dan steroid/triterpenoid [7]. Telah dibuktikan bahwa konsentrasi ekstrak belimbing wuluh sebesar 25% v/v efektif menghambat perkembangan bakteri *Streptococcus mutans*, dengan luas zona hambatan sebesar 10,1 mm [8].

Penelitian tambahan menunjukkan bahwa konsentrasi belimbing 10% menghasilkan daya hambat sebesar 28,6 mm terhadap bakteri *Staphylococcus epidermidis* dan 21,6 mm terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* [9]. Jumlah kecil belimbing dapat menghasilkan diameter zona hambat yang signifikan, menunjukkan kemanjurannya yang baik dalam mencegah pertumbuhan bakteri.

## METODE PENELITIAN

**Bahan :** Bahan kimia yang digunakan adalah etanol 96%, *n*-heksana, etil asetat, aquadest, *hydrogen peroxida*, pereaksi Mayer, kalium telurit 1%, *Liebermann Burchard*, larutan sitroborat, larutan *Dragendorff*, aseton, kristal violet, larutan FeCl<sub>3</sub> 1%, lugol iodine, plasma darah, amil alcohol, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, serbuk Mg, asam asetat pekat, safranin, HCl pekat dan antibiotik amoksisilin.

**Alat :** Alat yang digunakan antara lain labu Erlenmeyer, *water bath*, *chamber*, *autovortex mixer*, *beaker glass*, enkas, ejana maserasi, *rotary evaporator*, *Sterling Bidwell*, corong pisah, pipet volume, kertas saring, penggaris, kertas label, *object glass*, jarum ose, mikropipet, *vial*, inkubator,

autoklaf, corong kaca, gelas ukur, neraca analitik, spidol, desikator, piknometer, kapas lipid steril, kain *flannel*, cawan petri, pinset, rak dan tabung reaksi, stirrer magnetic, jangka sorong, ayakan *mesh* 40, mikropipet, *triangle* dan alat pencacah.

### Pengambilan dan determinasi tanaman

Determinasi tanaman belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) dilakukan di UPT Laboratorium Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT), Karanganyar, Jawa Tengah.

### Pembuatan serbuk buah belimbing wuluh

Buah belimbing dibersihkan dengan air mengalir untuk membuang kotoran yang mungkin menempel setelah tangkai yang tersisa dibuang. Setelah buah belimbing dipotong kecil-kecil, simplisia dibungkus dengan kain hitam dan dijemur di bawah sinar matahari. Kemudian, simplisia yang sudah kering disaring menggunakan saringan 40 *mesh*.

### Pembuatan ekstrak buah belimbing wuluh

Delapan liter pelarut etanol 96% ditambahkan ke dalam 800 gram serbuk belimbing yang dihasilkan setelah ditimbang. Setelah direndam sekitar enam jam, sambil sesekali dikocok, ekstrak dibiarkan selama delapan belas jam. Maserat dipisahkan dengan penyaringan, dan filtrat kemudian dipisahkan dengan kain flanel. Empat liter pelarut etanol 96% kemudian digunakan untuk mengolah kembali residu yang tersisa. Filtrat dan konsentrat selanjutnya disaring setelah residu direndam sekali lagi selama enam jam pertama, dikocok secara berkala, dan dibiarkan selama delapan belas jam. Sebuah *rotary evaporator* digunakan untuk mengonsentrasikan filtrat pada suhu 40°C, dan *waterbath* digunakan untuk menguapkan filtrat guna menghasilkan ekstrak kental.

### Fraksinasi

Untuk meningkatkan kelarutan, 10 gram ekstrak etanol belimbing diencerkan dalam 5 mililiter etanol dan kemudian ditimbang untuk melakukan fraksinasi. Kemudian disuspensi dengan 70 ml aquadest. 75 mililiter *n*-heksana digunakan untuk memisahkan ekstrak, dan corong pemisah dikocok tiga kali. Setelah lapisan *n*-heksana yang dihasilkan ditempatkan dalam wada dan dikeringkan dengan evaporator putar vakum, fraksi etil asetat merupakan hasil akhirnya. Fraksi air didapatkan dengan menguapkan air sisa partisi di atas *waterbath* sampai fraksi tersebut mengental, timbang tiga fraksi yang sudah diperoleh untuk menghitung persen rendemen terhadap bobot awal.

### Identifikasi kandungan kimia serbuk dan ekstrak

Satu gram ekstrak etanol buah belimbing ditimbang, dicampur dengan lima puluh mililiter aquadest dipanaskan selama sepuluh menit, didinginkan, disaring, dan filtratnya diambil untuk menambahkan reagen pengujian.

**Identifikasi flavonoid.** Tabung reaksi diisi

dengan bubuk magnesium secukupnya, 1 mililiter asam klorida, dan 2 mililiter amil alkohol. Filtrat kemudian dikocok dengan cepat dan dibiarkan terpisah. Flavonoid ada dalam sampel jika lapisan amil alkohol berubah menjadi merah, kuning, atau jingga [10].

**Identifikasi saponin.** Dua mililiter etanol 70%, air suling, dan pengocokan kuat selama 10 detik ditambahkan ke tabung reaksi yang berisi satu mililiter filtrat. Jika terbentuk busa hingga 1–10 cm, sampel mengandung saponin [11].

**Identifikasi tanin.** Satu mililiter filtrat dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dan tiga tetes FeCl<sub>3</sub> ditambahkan. Sampel mengandung komponen tanin jika warna akhir adalah hijau kehitaman [11].

**Identifikasi steroid/triterpenoid.** Sepuluh tetes asam anhidrat, tiga tetes H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, dua mililiter kloroform, dan satu mililiter filtrat ditambahkan melalui dinding tabung reaksi. Steroid terdapat dalam sampel jika terbentuk cincin merah; zat kimia triterpenoid hadir jika terbentuk warna merah atau ungu [12].

**Identifikasi alkaloid.** Tiga tabung reaksi yang berisi satu mililiter filtrat diisi, dan dua tetes reagen *Mayer*, *Bouchardat*, dan *Dragendorf* ditambahkan ke setiap tabung. Jika sampel mengandung alkaloid, akan terbentuk endapan putih pada *Mayer*, endapan merah hingga jingga pada *Dragendorf*, dan endapan merah hingga coklat pada *Bouchardat* [11].

**Identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus*.** *S. aureus* dapat diidentifikasi menggunakan pelat gores. Untuk menginokulasikan suspensi bakteri *S. aureus*, kultur bakteri digoreskan pada media MSA. Suspensi tersebut kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Media merah yang berubah menjadi kuning pada media MSA merupakan indikasi adanya koloni *Staphylococcus aureus*.

**Identifikasi *S. aureus* dengan Pewarnaan Gram.** Pewarnaan Gram diawali dengan membuat preparat ulas yang telah difiksasi. Oleskan kristal violet (Gram A) pada preparat secara merata, diamkan selama 1 menit, kemudian bilas preparat menggunakan aquadest. Tetesi larutan lugol (Gram B) pada preparat, diamkan selama 1 menit, bilas preparat menggunakan aquades dan keringkan. Tetesi alkohol pada preparat untuk melunturkan warna pada preparat, diamkan selama 30 detik, tetesi dengan safranin (Gram D), diamkan sebentar. Bilas preparat menggunakan aquadest, keringkan dengan melekatkan kertas tisu pada tepi ulasan, diamkan sampai ulasan mengering dan amati menggunakan mikroskop. Hasil Gram positif jika pada bakteri jika sel berbentuk *coccus*, susunan bergerombol berwarna ungu seperti buah anggur [4].

**Uji Katalase.** Pada *object glass* tambahkan beberapa tetes larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, kemudian letakkan 1 ose koloni bakteri pada *object glass* yang sama dan amati hasil yang terbentuk. Hasil positif jika terbentuk gelembung udara [4].

**Uji koagulase.** Sebanyak 200 µl plasma harus dipipet dan ditempatkan secara aseptik ke dalam tabung reaksi steril. Setelah menghomogenkan tiga hingga empat putaran kultur bakteri dalam tabung reaksi, inkubasi selama dua puluh empat jam pada suhu 37°C. Karena bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 termasuk dalam golongan bakteri koagulase-positif, gumpalan atau endapan di dasar tabung menunjukkan hasil positif [4].

#### **Pembuatan Suspensi Bakteri (Standardisasi Inokulum)**

Bakteri uji yang telah diinokulasi diambil dengan jarum ose steril lalu disuspensikan ke dalam tabung yang berisi 2 ml larutan NaCl 0,9% hingga di peroleh kekeruhan yang sama dengan standar kekeruhan larutan *Mc. Farland*.

#### **Uji aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi dengan metode difusi.**

Penelitian ini menggunakan metode *disc diffusion* (difusi cakram kertas). Kertas cakram (*paper disc*) digunakan sebagai wadah untuk menampung zat antibakteri. Kontrol positifnya adalah amoksisilin, dan kontrol negatifnya adalah DMSO 5%. Secara khusus, 20%, 10%, dan 5% senyawa antibakteri yang akan dinilai diencerkan pada setiap konsentrasi dan fraksi. Setelah bakteri uji disemai dan pelat agar diisi dengan media MHA, letakkan cakram kertas di atasnya dan lakukan tiga kali replikasi. Ukur dan periksa zona inhibisi yang terbentuk pada pelat setelah 18 hingga 24 jam inkubasi pada suhu 37°C. Diameter zona inhibisi dapat ditemukan menggunakan jangka sorong dengan mengukur zona terluar cakram kertas hingga batas terluar zona inhibisi. Keberadaan daerah yang tidak ditumbuhi bakteri uji memberikan bukti bahwa komposisi senyawa belimbing aktif terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

#### **Uji aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi dengan metode dilusi**

Untuk menemukan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM), metode pengenceran digunakan. Sepuluh tabung steril, dua untuk kontrol positif dan negatif, dan delapan untuk seri pengenceran digunakan dalam prosedur pengenceran. Setiap tabung memiliki berbagai seri konsentrasi: 50%, 25%, 12,5%, 6,25, 3,12, 1,56%, 0,78%, dan 0,39%. Dua mililiter fraksi aktif tertinggi digunakan sebagai kontrol negatif dalam tabung pertama, dan satu mililiter larutan suspensi bakteri digunakan sebagai kontrol positif dalam tabung kesepuluh. Tabung kedua berisi masing-masing satu mililiter fraksi aktif tertinggi dan media *Brain Heart Infusion* (BHI).

Satu mililiter media BHI ditambahkan ke masing-masing tabung kedua hingga sembilan. Satu mililiter dikeluarkan dari tabung kedua dan dimasukkan ke tabung ketiga setelah diaduk. Satu mililiter diambil dari tabung ketiga dan dimasukkan ke tabung keempat, dan seterusnya, hingga mencapai tabung kesembilan. Dari tabung kesembilan, ambil

satu mililiter dan buang. Volume 1 ml suspensi bakteri uji dalam media BHI yang telah disiapkan ditambahkan ke setiap tabung, kecuali tabung pertama dan kesepuluh, bersama dengan 2 ml kultur bakteri sebagai kontrol positif. Selama kurang lebih 24 jam, simpan semua tabung dalam inkubator yang diatur pada suhu 37°C. Catat kekeruhan yang muncul selama waktu ini. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dapat ditentukan dengan mengetahui konsentrasi terendah pada tabung bening. Standar kekeruhan untuk validasi validitas uji antibakteri didasarkan pada kontrol (+) dan kontrol (-) sebagai pembanding. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) untuk *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ditentukan menggunakan konsentrasi terendah ekstrak dan fraksi paling aktif yang tidak tumbuh pada media MSA. Tabung bening digoreskan pada media *Mannitol Salt Agar* (MSA) diinokulasikan dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Periksa MSA untuk melihat koloni.

#### Identifikasi golongan senyawa pada fraksi teraktif secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

**Identifikasi senyawa flavonoid.** Fase diamnya adalah silika gel GF<sub>254</sub>, fase geraknya adalah kloroform: etil asetat (6:4) hingga 8 ml, dan amonia digunakan untuk tampilan noda uap guna mengidentifikasi flavonoid menggunakan standar acuan quercetin dan reagen semprot, sitroborat. Dengan menggunakan rutin dan quercetin sebagai standar acuan, sinar UV pada 254 nm meredam, sedangkan sinar UV pada 366 nm menghasilkan fluoresensi dan noda biru yang berubah menjadi hitam saat diuapkan dengan amonia [13].

**Identifikasi senyawa tanin.** Kromatografi Lapis Tipis dapat digunakan untuk mengidentifikasi senyawa tanin. Delapan mililiter n-heksana: etil asetat (6:4) digunakan sebagai fase gerak, sedangkan silika gel GF254 digunakan sebagai fase diam. Asam galat dan FeCl<sub>3</sub> sebagai reagen semprot juga berfungsi sebagai standar referensi untuk identifikasi ini. Hasil positif jika terbentuk bintik hitam setelah terpapar

radiasi UV pada 254 nm dan 366 nm [14].

## HASIL DAN PEMBAHASAN

**Determinasi tanaman.** Untuk mencegah kesalahan dalam pengambilan sampel, penentuan tanaman dilakukan dengan mencocokkan ciri morfologi tanaman belimbing yang digunakan dalam penelitian. Berdasarkan hasil penentuan, tanaman yang diteliti diidentifikasi sebagai tanaman belimbing sejati.

**Pembuatan serbuk buah belimbing wuluh.** Berat serbuk yang diperoleh sebesar 1000 g dari berat kering buah belimbing wuluh sebesar 4200. Rendemen yang diperoleh dari bobot serbuk terhadap berat buah kering sebesar 21%.

**Hasil pembuatan ekstrak buah belimbing wuluh.** Ekstrak belimbing wuluh yang dihasilkan sebanyak 150 gram dengan rendemen sebesar 18,75%. Nilai rendemen yang diperoleh menunjukkan bahwa rendemen ekstrak memenuhi kriteria Farmakope Herbal Indonesia yang mengharuskan rendemen ekstrak minimal 6,8% [15].

#### Fraksinasi.

Persentase fraksi n-heksana (6,22%), fraksi etil asetat (6,47%), dan fraksi air (49,2%) diperoleh dari proses pembuatan fraksi dari ekstrak belimbing. Fraksi etil asetat bersifat semi-polar, yang memungkinkannya menarik senyawa dari kelompok flavonoid dan polifenol, sedangkan persentase rendemen fraksi n-heksana memiliki nilai rendemen terendah, yang menunjukkan bahwa beberapa senyawa yang ditemukan dalam belimbing merupakan senyawa non-polar seperti steroid dan triterpenoid [16]. Namun, hasil fraksi air lebih tinggi daripada fraksi lainnya karena belimbing mengandung sejumlah zat kimia polar, termasuk alkaloid, tanin, dan saponin. Kapasitas pelarut untuk menarik zat kimia yang ada dalam ekstrak etanol belimbing, yang juga bervariasi, menjelaskan variasi dalam % hasil setiap fraksi.

### Hasil identifikasi kandungan senyawa serbuk dan ekstrak buah belimbing wuluh

Table 1. Hasil identifikasi kandungan senyawa serbuk dan ekstrak buah belimbing wuluh

Kandungan senyawa	Pustaka	Interpretasi hasil	
		Serbuk	Ekstrak
Flavonoid	Terdapat warna merah atau kuning pada lapisan amil alkohol	Warna kuning pada lapisan amil alkohol (+)	Warna merah pada lapisan amil alkohol (+)
Tanin	Menghasilkan warna hijau kehitaman	Warna hijau kehitaman (+)	Warna hijau kehitaman (+)
Saponin	Terbentuk busa, dan busanya tidak hilang kurang dari 10 menit	Terbentuk Busa yang stabil (+)	Terbentuk busa yang stabil (+)
Steroid/ triterpenoid	Positif steroid jika terbentuk cincin warna merah dan positif triterpenoid jika terbentuk warna merah atau ungu	Terbentuk cincin warna merah (+ steroid) dan terbentuk warna merah (+triterpenoid)	Terbentuk cincin warna merah (+ steroid) dan terbentuk warna merah (+triterpenoid)
Alkaloid	Positif Mayer jika terbentuk endapan putih agak kuning, positif Dragendorf jika terbentuk warna merah hingga jingga dan positif	Mayer : tidak ada endapan putih (-) Dragendorf : warna merah (+)	Mayer : terbentuk endapan putih (+) Dragendorf : warna merah (+) Bourchardat : endapan

Bouchardat jika terbentuk endapan warna coklat sampai hitam	Bourchardat : endapan coklat-kehitaman (+)	coklat-kehitaman (+)
---	--	----------------------

Keterangan :

(+) : Ada senyawa

(-) : tidak ada senyawa

Hasil identifikasi kandungan kimia pada Tabel 1 menunjukkan hasil yang sama dengan penelitian lain: komponen flavonoid, alkaloid, saponin, steroid/triterpenoid, dan tanin terdapat dalam ekstrak belimbing.

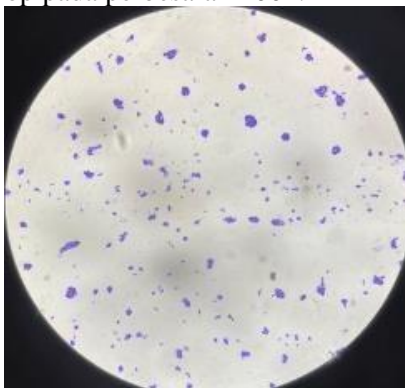
#### Hasil Identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

**Identifikasi *S. aureus* dengan cawan gores.** Terbentuknya koloni bakteri berwarna kuning, bulat, dan cembung pada media *Mannitol Salt Agar* (MSA), hasil pengujian menunjukkan bahwa bakteri tersebut sebenarnya adalah *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Kemampuan bakteri untuk memfermentasi manitol inilah yang menyebabkan koloni tersebut berubah menjadi kuning.



Gambar 1. Hasil uji bakteri *S. aureus* pada cawan petri

**Identifikasi bakteri dengan pewarnaan Gram.** Bakteri tersebut berbentuk bulat dan berwarna ungu, menyerupai buah anggur, menurut hasil pewarnaan Gram yang terlihat di bawah mikroskop pada perbesaran 100x.



Gambar 2. Hasil pewarnaan Gram

**Uji katalase.** Timbulnya gelembung-gelembung dan oksigen pada objek kaca menunjukkan hasil positif dari uji katalase. Kemampuan bakteri untuk menghasilkan katalase, yaitu katalis dalam pemecahan hydrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) menjadi  $H_2O$  dan  $O_2$ , adalah penyebab

munculnya gelembung-gelembung dan oksigen.



Gambar 3. Hasil uji katalase

**Uji koagulase.** Produksi gumpalan dalam plasma menunjukkan bahwa bakteri tersebut sebenarnya adalah *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, menurut hasil identifikasi. Enzim koagulase dalam plasma EDTA bereaksi untuk mengubah fibrinogen menjadi fibrin, yang menyebabkan terjadinya gumpalan ini.



Gambar 4. Hasil uji koagulase

#### Hasil pengujian aktivitas antibakteri buah belimbing wuluh dengan metode difusi cakram terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Penelitian ini menggunakan metode *disc diffusion* (difusi cakram kertas). Kertas cakram (*paper disc*) digunakan sebagai wadah untuk menampung zat antibakteri. Daerah di sekitar cakram sampel tempat bakteri tidak berkembang biak dalam melawan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dikenal sebagai diameter penghambatan. Kaliper digunakan untuk mengukur diameter penghambatan, yang kemudian dikonversi ke milimeter.

Tabel 2. Diameter zona hambat pada uji antibakteri buah belimbing wuluh terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Sampel	Konsentrasi (%)	Diameter hambat (mm)			Rata-rata $\pm$ SD
		Replikasi			
		1	2	3	
Ekstrak	20%	12,90	19,07	19,14	17,04 $\pm$ 3,58
	10%	12,36	18,51	15,5	15,46 $\pm$ 3,08
	5%	8,7	13,24	11,45	11,13 $\pm$ 2,29
Fraksi <i>n</i> -heksana	20%	13,49	20,33	18,83	14,43 $\pm$ 3,60
	10%	9,65	17,74	15,90	14,43 $\pm$ 4,24
	5%	9,36	13,86	11,56	11,59 $\pm$ 2,25
Fraksi etil asetat	20%	22,47	30,80	25,68	26,32 $\pm$ 4,20
	10%	15,75	21,9	18,85	18,83 $\pm$ 3,08
	5%	10,66	14,36	13,11	12,71 $\pm$ 1,88
Fraksi air	20%	13,61	21,04	19,49	18,05 $\pm$ 3,92
	10%	13,21	17,54	15,62	15,46 $\pm$ 2,17
	5%	9,53	13,39	10,83	11,25 $\pm$ 1,96
Amoksisilin	1%	20,37	20,49	20,79	20,55 $\pm$ 0,22
DMSO	5%	0	0	0	0,0 $\pm$ 0,0

Berdasarkan hasil penelitian, terdapat zona penghambatan pada ekstrak karena etanol, pelarut ekstraksi, bersifat semi-polar hingga polar, mengandung bahan kimia dengan sifat antibakteri. Ekstrak tersebut masih mengandung bahan kimia yang kompleks, oleh karena itu aktivitas yang terjadi tidak terbatas pada aktivitas antibakteri, jika dibandingkan dengan fraksi etil asetat.

Sebagian besar zat dengan sifat antibakteri merupakan kelompok kimia semi-polar hingga polar. fraksi air dan etil asetat mengandung senyawa yang lebih spesifik daripada fraksi ekstrak dan *n*-heksana, hal ini ditunjukkan dengan adanya zona hambat yang lebih besar.

Fraksi etil asetat memiliki diameter zona penghambatan tertinggi terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, berukuran 26,32  $\pm$  mm pada konsentrasi 20%, 18,8  $\pm$  3,08, dan 12,7  $\pm$  1,88 pada konsentrasi 10%, 5%, dan 20%.

Zona penghambatan rata-rata amoksisilin, kontrol positif, adalah 20,55  $\pm$  0,22, sedangkan DMSO 5%, kontrol negatif, tidak menunjukkan penghambatan terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Karena tidak ada zona yang jelas terbentuk di sekitar cakram, kontrol negatif (DMSO 5%) tidak menunjukkan aktivitas antibakteri. Dari data tersebut dapat disimpulkan bahwa ekstrak merupakan satu-satunya sumber zona penghambatan, sedangkan pelarut tidak berpengaruh terhadap fraksi belimbing (*Averrhoa bilimbi* L.). Fraksi yang paling efektif untuk mencegah pertumbuhan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 adalah etil asetat. Karena fraksi *n*-heksana merupakan fraksi penghambat terkecil, maka fraksi ini mempunyai aktivitas bakterisida yang lebih kecil dibandingkan ekstrak dan fraksi lainnya. Karena *n*-heksana merupakan pelarut nonpolar, maka ia hanya dapat menarik zat-zat nonpolar. Aktivitas

antibakteri fraksi air lebih tinggi daripada fraksi *n*-heksana dan lebih rendah daripada fraksi etil asetat. Air dapat menarik senyawa polar dan semi-polar seperti tanin, saponin, dan alkaloid yang merupakan agen antibakteri karena merupakan pelarut polar. Dibandingkan dengan ekstrak dan fraksi lainnya, etil asetat mempunyai aktivitas penghambatan paling kuat karena dapat menarik senyawa dari kelompok alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, polifenol, dan triterpenoid [16].

Data yang diperoleh dari uji aktivitas antibakteri dengan difusi kemudian dievaluasi menggunakan uji One Way ANOVA (*Analysis of Variance*) yang membandingkan sampel, khususnya ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dengan konsentrasi masing-masing 20%, 10%, dan 5%, dengan antibiotik amoksisilin sebagai kontrol positif dan DMSO 5% sebagai kontrol negatif. Uji *Shapiro-Wilk* menghasilkan nilai signifikansi  $> 0,05$ , yang menunjukkan bahwa data terdistribusi normal, data dapat dilanjutkan ke uji One Way ANOVA. Uji One Way ANOVA digunakan untuk menentukan perbedaan kelompok. Mengingat nilai signifikansi adalah  $0,000 < 0,05$ , dapat disimpulkan dari hasil uji terdapat perbedaan antar kelompok. Hasil uji homogenitas dengan nilai signifikansi  $0,117 > 0,05$ , sehingga data dikatakan homogen. Selanjutnya, tabel *Tuckey* HSD terdapat tanda \* pada *Mean Difference* yang berarti perbedaan diameter hambat aktivitas antibakteri tersebut signifikan. Kontrol negatif berbeda nyata dengan kontrol positif (amoksisilin), ekstrak 20%, ekstrak 10%, ekstrak 5%, *n*-heksana 20%, *n*-heksana 10%, *n*-heksana 5%, etil asetat 20%, etil asetat 10%, etil asetat 5%, air 20%, air 10%, dan air 5%, berdasarkan hasil uji *Tuckey* pada subset 1. Hal ini menunjukkan bahwa sementara kelompok sampel lain menghasilkan zona

penghambatan, kontrol negatif tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara ekstrak 5%, air 5%, dan *n*-heksana 5% pada subset 2 dan kontrol positif, yang menunjukkan bahwa meskipun sampel menciptakan zona penghambatan, zona tersebut tidak sama dengan zona penghambatan yang dihasilkan oleh kontrol positif. Pada subset 3, fraksi etil asetat 5%, *n*-heksana 10%, ekstrak 10%, air 10%, ekstrak 20% memiliki zona hambat yang sebanding dengan kontrol positif, artinya sampel tersebut dapat memberikan daya hambat yang sebanding, tetapi pada subset 4, *n*-heksana 20%, air 20% dan etil asetat 10% dan etil asetat 20% memiliki daya hambat yang paling baik dan sebanding dengan kontrol positif. Hanya fraksi etil asetat 20% yang terdapat dalam subset 4, baik karena fraksi ini memiliki daya hambat paling tinggi dan aktivitas antibakteri paling aktif, atau karena fraksi ini berbeda secara signifikan dari kelompok lain, atau karena aktivitas antibakterinya lebih tinggi daripada kontrol positif. Secara statistik, tidak terdapat perbedaan yang signifikan ( $p = 0,051$ ) antara aktivitas daya hambat Fraksi Etil Asetat 20% (26,31 mm) dengan Kontrol Positif (20,55 mm). mengindikasikan pada konsentrasi 20%, fraksi etil asetat memiliki potensi daya hambat yang setara dengan antibiotik pembanding (kontrol positif). Diameter hambat tiap subset memiliki perbedaan aktivitas antibakteri dan semakin ke kanan, maka diameter hambatnya semakin besar [17].

#### Hasil pengujian aktivitas antibakteri buah belimbing wuluh dengan metode dilusi cair terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Fraksi etil asetat merupakan fraksi yang paling aktif dalam penelitian ini. Fraksi etil asetat yang dihasilkan kemudian dilakukan pengujian aktivitas antibakteri menggunakan uji pengenceran cair dan pengenceran padat untuk menentukan nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Tabel 3. Hasil penentuan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) fraksi teraktif terhadap bakteri

<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923					
NO	Konsentrasi (% b/v)	Replikasi			
1	Kontrol (-)	-	-	-	-
2	50%	-	-	-	-
3	25%	-	-	-	-
4	12,5%	-	-	-	-
5	6,25%	+	+	+	+
6	3,12%	+	+	+	+
7	1,56%	+	+	+	+
8	0,78%	+	+	+	+
9	0,39%	+	+	+	+
10	Kontrol (+)	+	+	+	+

#### Keterangan

- (-) : tidak ada pertumbuhan bakteri  
 (+) : ada pertumbuhan bakteri  
 Kontrol (-) : fraksi teraktif  
 Kontrol (+) : suspensi bakteri

Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) tidak dapat ditentukan karena kekeruhan dan kejernihan tabung pengenceran setelah masa inkubasi 24 jam pada suhu 37°C tidak dapat dinilai. Metode visual memiliki keterbatasan pada ekstrak berwarna pekat, sehingga parameter efektivitas dialihkan pada nilai KBM (bakterisidal). Untuk memastikan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) atau konsentrasi saat bakteri berhenti tumbuh, data yang dikumpulkan juga ditetaskan ke *Media Salt Agar* (MSA) dan diinkubasi selama 24 hingga 48 jam pada suhu 37°C. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) berada pada konsentrasi 50%, 25%, dan 12,5% pada *Media Salt Agar* (MSA) karena bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 tidak tumbuh pperada kuadran konsentrasi 50%, 25%, dan 12,5%.

#### Identifikasi kandungan senyawa fraksi terkafit secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT).

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan salah satu metode pemisahan fitokimia. Tujuan identifikasi ini adalah untuk menemukan senyawa-senyawa yang terkandung dalam bagian buah belimbing yang paling aktif.

Tabel 4. Hasil uji identifikasi kandungan kimia fraksi etil asetat secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Identifikasi golongan senyawa	Sediaan uji	Rf	Hasil identifikasi golongan senyawa		
			UV 254 nm	UV 366 nm	Pereaksi
Flavonoid	Fraksi etil asetat	A1 = 0,37	Meredam	Noda biru	Kuning-kecoklatan (Sitroborat)
		A2 = 0,78			
		B1 = 0,27			
Tanin	Fraksi etil asetat Asam galat	B2 = 0,45	Meredam	Noda biru-kehitaman	Noda hitam pada sampel dan baku pembanding (FeCl3)
		B3 = 0,78			
		A = 0,75			
		B = 0,76			

Hasil tersebut di atas menunjukkan bahwa komponen flavonoid dan tanin terdapat dalam fraksi belimbing yang paling aktif. Dengan menggunakan kloroform: etil asetat (6:4) sebagai fase gerak, silika gel GF254 sebagai fase diam, quercetin sebagai standar acuan, dan reagen semprot sitroborat, senyawa flavonoid pertama kali diidentifikasi. Hasil peredaman dengan latar belakang hijau pada pelat kemudian dideteksi di bawah sinar UV 254 nm, dan deteksi lebih lanjut menggunakan sinar UV 366 nm menunjukkan fluoresensi, khususnya bintik-bintik biru. Setelah penetesan amonia dan penyemprotan reagen sitroborat, menunjukkan pergeseran warna kuning kecokelatan. Standar acuan memiliki tiga nilai Rf (Rf 0,27, Rf 2 0,45, dan Rf 3 0,78), sedangkan sampel memiliki dua nilai Rf (Rf 1 0,37 dan Rf 2 0,78).

Nilai Rf sampel uji dan standar referensi hampir sama, dapat dikatakan bahwa fraksi etil asetat termasuk senyawa kuarsetin. Kuarsetin dapat memecah membran sel bakteri dan mendenaturasi protein sel, ia memiliki sifat antibakteri. Dengan membentuk hubungan rumit dengan protein membran, kuarsetin menurunkan permeabilitas membran dan bertindak sebagai antibakteri [18].

Molekul tanin diidentifikasi menggunakan n-heksana: etil asetat (6:4) sebagai fase gerak, silika gel GF254 sebagai fase diam, asam galat sebagai standar acuan, dan reagen semprot FeCl<sub>3</sub>. Setelah itu, zat kimia tersebut ditemukan saat terpapar radiasi UV 254 nm dan 366 nm. Sampel dan standar acuan dianggap positif saat bintik hitam muncul di bawah sinar UV 254 nm dan saat bintik merah muda dan biru-hitam terbentuk di standar acuan, masing-masing, di bawah sinar UV 366 nm. FeCl<sub>3</sub> kemudian disemprotkan pada sampel dan standar acuan, sehingga terbentuk bintik hitam pada keduanya. Nilai Rf sampel adalah 0,76, tetapi standar referensi adalah 0,75. Keberadaan senyawa tanin dalam raksi etil asetat ditunjukkan oleh nilai Rf sampel dan standar referensi yang hampir identik dalam pengujian ini. Karena target pada dinding sel tidak terbentuk dengan baik mekanisme kerja antibakteri tanin melibatkan terjadinya lisis pada bakteri. Selain itu, tanin dapat menonaktifkan enzim bakteri dan mengganggu pergerakan protein dalam membran sel [19].

Keterbatasan penelitian (limitasi) terkait hasil Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) tidak dapat ditentukan secara visual karena kekeruhan ekstrak. Identifikasi senyawa pada KLT hanya bersifat kualitatif (bukan kuantitatif), Penelitian ini belum menguji toksisitas ekstrak terhadap sel mamalia."

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan dapat disimpulkan bahwa :

Ekstrak, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan

fraksi dari air ekstrak etanol buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Fraksi etil asetat merupakan fraksi teraktif dari ekstrak etanol buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dengan diameter zona hambat sebesar 26,32 mm pada konsentrasi 20%.

Nilai KHM tidak dapat diamati secara visual akibat kekeruhan ekstrak, namun efektivitas antibakteri dikonfirmasi melalui nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KBM) fraksi etil asetat dari ekstrak etanol buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) sebagai aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yaitu pada konsentrasi 12,5%.

Fraksi etil asetat teridentifikasi mengandung senyawa golongan flavonoid (termasuk kuarsetin) dan tanin yang diduga berperan dalam aktivitas antibakteri.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Pada kesempatan ini, dengan segala kerendahan hati, penulis mengucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada Tuhan Yang Maha Esa, kedua orang tua, keluarga, dosen pembimbing, dosen penguji, sahabat, dan teman-teman yang telah memberikan dorongan, motivasi, dan semangat selama pengerjaan penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- [1]. Okoro, E, Ogunbiyi, A, George, A 2016, 'Prevalence and pattern of acne vulgaris among adolescents in badan, south-west Nigeria', *Journal of the Egyptian Women's Dermatologic Society*, 13(1), pp. 7–12.
- [2]. Sawarkar, H.A., Khadabadi, S.S., Mankar, D.M., Farooqui, I.A., Jagtap, N.S., 2010., Development and Biological Evaluation Of Herbal Anti-Acne Gel., vol.2, no.3, pp 2028-2031., *International Journal Of PharmTech Research*
- [3]. Sarlina, Razak, A. R., & Tandah, M. R. (2017). Uji Aktivitas Antibakteri Sediaan Gel Ekstrak Daun Sereh (*Cymbopogon nardus* L. Rendle) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* Penyebab Jerawat.3(2), 143149.<https://doi.org/10.22487/j24428744.2017.v3.i2.8770>
- [4]. Dewi, A. K. 2013. Isolasi, Identifikasi dan Uji Sensitivitas *Staphylococcus aureus* Terhadap Amoxicillin Dari Sampel Susu Kambing Peranakan Ettawa (PE) Penderita Mastitis di

Wilayah Girimulyo, Kulonprogo, Yogyakarta.  
*Jurnal Sain Veteriner*, 31(2), 138-150.

Flavonoid dalam Daun Beluntas (*Pluchea indica* L.). *Pharmacon* 1(1)

- [5]. Wijastuti, L. 2011. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Kulit Buah Jeruk Manis (*Citrus sinensis* L.) *Osbeck*) Terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* Multiresisten Serta Brine Shrimp Lethality Test. Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- [6]. Sibero, H. T., Putra, I. W. A., & Anggraini, D. I. 2019. Tatalaksana Terkini *Acne vulgaris*. *Jurnal Kedokteran Universitas Lampung*, 3(2), 313-320.
- [7]. Yanti, S., & Vera, Y. (2019). Skrining fitokimia ekstrak daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*). *Jurnal Kesehatan Ilmiah Indonesia (Indonesian Health Scientific Journal)*, 4(1), 41-46.
- [8]. Rahmiati, A., Haryati, T., & Kurniawan, E. 2017. Daya Hambat Ekstrak Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Streptococcus mutans* Secara *in vitro*. *Media of Medical Laboratory Science*, 1(1), 13-18.
- [9]. Rahmiati, Asri, Sri Darmawati, and Ana Hidayati Mukaromah. "Daya hambat Ekstrak Etanol Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Staphylococcus epidermidis* secara *in vitro*." *Prosiding Seminar Nasional & internasional*. Vol. 1. No. 1. 2017.
- [10]. Sarker., Zahid Latif., Alexander Gray. 2006. *Natural Product Isolation 2nd Humana Press Inc*, Totowa, New Jersey
- [11]. Setyowati, W. A., Sri, R. D. A., Ashadi., Mulyani, B., Cici, P. R. 2014. Skrining Fitokimia dan Identifikasi Komponen Utama Ekstrak Metanol Kulit Kayu Durian (*Durio zibethinus* Murr.) Varietas Petruk. Seminar Nasional Kimia dan Pendidikan VI. ISBN: 9779373174-0: 271-280
- [12]. Ghosal, M. & Mandal, P. 2012. Phytochemical screening and antioxidant activities of two selected "Bihi" fruits used as vegetables in Darjeeling Himalaya. *Int. J. Pharm. Sci.* 4(2)
- [13]. Koirewoa, Y. A., Fatimali, Wiyono, W. I. 2012. Isolasi dan Identifikasi Senyawa
- [14]. Kusumo, G. G., Fernanda, M. H. F., & Asroriyah. H. 2017. Identifikasi Senyawa Tanin Pada Daun Kemuning (*Murraya Paniculata* L. Jack) Dengan Berbagai Jenis Pelarut Pengekstraksi. *Journal of Pharmacy and Science* 2:29-32.
- [15]. Departemen Kesehatan. 2017. Farmakope Herbal Indonesia.
- [16]. Putri, W. S., Warditiani, N. K., & Larasanty, L. P. F. (2013). Skrining fitokimia ekstrak etil asetat kulit buah manggis (*Garcinia mangostana* L.). *Jurnal Farmasi Udayana*, 2(4), 56-60.
- [17]. Prayoga, T., Lisnawati, N., Sari, P. E., & Ningsih, F. S. (2022). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol 96% Daun Cincau Hijau (*Premna oblongifolia* Merr) Terhadap Bakteri *Propionibacterium acnes* Penyebab Jerawat. *Jurnal Komunitas Farmasi Nasional*, 2(2).
- [18]. Nurul, A. R. (2012). Formulasi Sediaan Gel Anti Jerawat Ekstrak Etanol Daun Ketepeng Cina (*Cassia alata* Linn.) dengan *Basis HPMC*. Skripsi, Universitas Lambung Mangkurat, Banjarbaru.
- [19]. Ngajow M, Abidjulu J, Kamu VS. 2013. Pengaruh antibakteri ekstrak kulit batang matoa (*Pometia pinnata*) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*. *Jurnal MIPA UNSRAT Online*. 2(2). h. 128-32