



**POTENSI ISOLAT FRAKSI DAUN TEBU
SEBAGAI PENGHAMBAT PERTUMBUHAN
BAKTERI *Staphylococcus aureus* ATCC 25923**

Skripsi
disusun sebagai salah satu syarat
untuk memperoleh gelar Sarjana Sains
Program Studi Biologi

oleh
Fadilatul Chulaiwiyah
4411416030

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI SEMARANG
2020**

PERNYATAAN

Dengan ini, saya :

Nama : Fadilatul Chulaiwiyah

NIM : 4411416030

Program studi : Biologi

Menyatakan bahwa skripsi yang berjudul “Potensi Isolat Fraksi Daun Tebu sebagai Penghambat Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923” adalah benar-benar karya saya, bukan jiplakan dari karya orang lain atau pengutipan dengan cara-cara yang tidak sesuai etika keilmuan yang berlaku baik sebagian atau seluruhnya. Pendapat atau hasil penelitian dari orang lain yang terdapat dalam skripsi ini telah dikutip atau dirujuk berdasarkan kode etik ilmiah. Atas pernyataan ini, saya pribadi siap menanggung risiko/sanksi hukum yang dijatuhkan apabila ditemukan pelanggaran terhadap etika keilmuan yang terdapat pada skripsi ini.



NIM.4411416030

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Potensi Isolat Fraksi Daun Tebu sebagai Penghambat Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923” disusun oleh :

nama : Fadilatul Chulaiwiyah

NIM : 4411416030

Telah dipertahankan di hadapan sidang Panitia Ujian Skripsi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Semarang pada tanggal 03 Juli 2020 dan disahkan oleh Panitia Ujian.

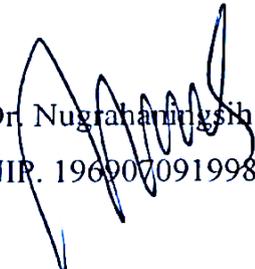
Panitia Ujian



Penguji I,


Dr. Pramesti Dewi, M.Si.
NIP.196509081989032001

Sekretaris


Dr. Nugrahaningih WH, M.Kes.
NIP. 196907091998032001

Penguji II,


Drs. Krispinus Kedati Pukan, M.Si.
NIP.195507311985031002

Pembimbing


Talitha Widiatningrum, M.Si., Ph.D.
NIP.198009292005012004

MOTTO DAN PERSEMBAHAN

MOTTO :

The future belongs to those who prepare for it today. (Malcolm X)

PERSEMBAHAN :

Skripsi ini dipersembahkan bagi masyarakat, petani tebu, dan instansi yang memanfaatkan tanaman herbal sebagai antibakteri serta Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Semarang.

PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT yang telah memberikan rahmat, karunia dan hidayah serta kemudahan dalam menyelesaikan skripsi yang berjudul “Potensi Isolat Fraksi Daun Tebu sebagai Penghambat Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923”. Skripsi ini adalah bagian dari penelitian payung Talitha Widiatningrum, M.Si., Ph.D. Penyusunan skripsi dilakukan untuk memenuhi salah satu syarat memperoleh gelar Sarjana Sains, Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Semarang. Penyusunan skripsi ini dapat diselesaikan tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak yang telah memberikan dukungan, doa dan saran, oleh karena itu penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. Rektor Universitas Negeri Semarang yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk melaksanakan studi Strata 1 (S1) Program Studi Biologi, FMIPA, Unnes.
2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Semarang yang telah memberikan kemudahan dalam pengurusan administrasi saat proses penyusunan skripsi.
3. Ketua jurusan Biologi, Universitas Negeri Semarang yang memberikan kemudahan pengurusan administrasi saat proses penyusunan skripsi.
4. Talitha Widiatningrum, M.Si., Ph.D. selaku dosen pembimbing skripsi serta ketua dari penelitian payung di Jurusan Biologi yang telah meluangkan waktunya dan sabar dalam membimbing serta membagi ilmu kepada penulis.
5. Dr. Pramesti Dewi, M.Si. selaku penguji utama yang telah berkenan menelaah dan memberikan saran yang sangat berarti dalam penyelesaian skripsi ini.
6. Drs. Krispinus Kedati Pukan, M.Si. selaku penguji kedua yang telah berkenan menelaah dan memberikan saran yang sangat berarti dalam penulisan skripsi ini.
7. Muhammad Abdullah, S.Si, M.Sc. selaku dosen wali yang selalu memberikan arahan, nasihat dalam menyelesaikan skripsi.

8. Kepala dan Staf Laboratorium Jurusan Biologi atas semua pelayanan dan fasilitas yang telah disediakan sehingga memudahkan penulis untuk menyelesaikan penelitian.
 9. Bapak Sulaiman dan Ibu Kasri selaku orang tua serta seluruh keluarga yang senantiasa mendoakan, memberikan dukungan, nasihat, motivasi kepada penulis untuk menyelesaikan skripsi ini.
 10. Arsyad Toriqudin yang selalu memberikan nasihat dan semangat yang sangat berarti bagi penulis saat penelitian dan penyusunan skripsi.
 11. Nur Hikmah dan Umi Latifah sebagai sahabat sekaligus tim dalam melaksanakan penelitian payung di Laboratorium Biologi Unnes dan Laboratorium Mikrobiologi Undip.
 12. Sahabat – sahabat di Pondok Pesantren Durrotu Aswaja yang selalu menerima keluh kesah dan memberikan semangat.
 13. Sahabat dan teman rombel 1 Biologi FMIPA angkatan 2016 yang selalu membantu dan memberi semangat.
 14. Seluruh pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu oleh penulis yang selalu membantu dan mendoakan selama proses penyusunan skripsi.
- Pada akhirnya penulis mengucapkan terima kasih kepada pembaca yang telah berkenan membaca skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat memberikan tambahan ilmu pengetahuan yang bermanfaat bagi pembaca.

Semarang, 03 Juli 2020



Penulis

ABSTRAK

Chulaiwiyah, F. 2020. *Potensi Isolat Fraksi Daun Tebu sebagai Penghambat Pertumbuhan Bakteri Staphylococcus aureus ATCC 25923*. Skripsi, Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang. Pembimbing Talitha Widiatningrum, M. Si, Ph. D.

Kata kunci : antibakteri , isolat fraksi daun tebu, *S. aureus*.

Bakteri *Staphylococcus aureus* adalah patogen penyebab infeksi invasif pada manusia. Namun saat ini, *S. aureus* menunjukkan sifat resisten terhadap beberapa antibiotik sehingga diperlukan bahan alam untuk menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus*. Bahan alam yang potensial untuk digunakan adalah daun tebu yang selama ini hanya dimanfaatkan sebagai pakan ternak dengan nilai nutrisi yang rendah. Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk (1) mendeteksi isolat fraksi terduga tunggal berdasarkan kromatografi lapis tipis dan spektrofotometri pada ekstrak daun tebu, (2) menganalisis kemampuan isolat fraksi terduga tunggal untuk menghambat pertumbuhan *S. aureus* serta (3) menganalisis senyawa yang terdapat pada isolat fraksi terduga tunggal yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *S. aureus*. Spesifikasi bakteri yang digunakan pada penelitian ini adalah *S. aureus* ATCC 25923. Prosedur penelitian yang dilakukan terdiri dari preparasi berupa ekstraksi dan fraksinasi serta uji laboratoris berupa (a) uji kemurnian untuk mendeteksi senyawa terduga tunggal dengan KLT dan spektrofotometri, (b) uji antibakteri dan (c) identifikasi senyawa metabolit sekunder. Fraksinasi ekstrak daun tebu menggunakan kromatografi kolom untuk mendapatkan isolat fraksi dengan 7 komposisi perbandingan eluen n-heksana dan etil asetat. Isolat yang ditampung dari setiap fraksi ada 5 buah dengan volume masing-masing adalah 10 ml. Setiap fraksi lalu diuji kemurnian senyawa didalamnya dengan KLT dan spektrofotometri. Uji antibakteri dilakukan dengan metode difusi cakram untuk setiap fraksi yang terduga tunggal. Identifikasi metabolit sekunder dilakukan dengan menggunakan LC-MS. Hasil penelitian menunjukkan (1) terdapat isolat fraksi terduga tunggal berdasarkan kromatografi lapis tipis dan spektrofotometri sejumlah 5 fraksi, (2) adanya penghambatan pertumbuhan terhadap *S. aureus* ATCC 25923 oleh fraksi terduga tunggal dengan aktivitas tertinggi adalah dari fraksi keempat sebesar 14,5 mm, serta (3) fraksi terduga tunggal mengandung senyawa fenol yaitu gallic acid, caffeic acid, ferulic acid, senyawa flavonoid yaitu quercetin, isorhamnetin-3-O-glucoside, 2''-O- α -L-rhamnosyl-6-C-fucosyl-luteolin, quercetin-3-O neohesperidoside, tricetin-7-neohesperidoside, dan tricetin-7-rutinoside, tricetin-7-rhamnosyl-(1 \rightarrow 2)-galacturonide, serta senyawa saponin yaitu Isoarborinol, α -amyrin, cycloartenol, fernenol, arundoin dan senyawa steroid yaitu β -sitosterol.

DAFTAR ISI

	Halaman
JUDUL	i
PERNYATAAN	ii
PENGESAHAN	iii
MOTTO DAN PERSEMBAHAN	iv
PRAKATA	v
ABSTRAK	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Penegasan Istilah	3
1.4 Tujuan Penelitian	4
1.5 Manfaat Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Tinjauan Pustaka	5
2.1.1 Tebu (<i>Saccharum officinarum</i> L.)	5
2.1.2 Bakteri <i>S. aureus</i>	7
2.1.3 Antibakteri	8
2.2 Kerangka Berpikir	9
2.3 Hipotesis	9
BAB III METODE PENELITIAN	10
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	10
3.2 Subjek Penelitian	10
3.3 Variabel Penelitian	10
3.3.1 Variabel Bebas	10
3.3.2 Variabel Terikat	11
3.3.3 Variabel Kendali	11
3.4 Rancangan Penelitian	11

3.4.1 Alur Penelitian	12
3.5 Alat dan Bahan Penelitian.....	13
3.5.1 Alat Penelitian	13
3.5.2 Bahan Penelitian	14
3.6 Prosedur Penelitian.....	14
3.7 Analisis Data	17
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	18
4.1 Uji Kemurnian.....	18
4.2 Uji Antibakteri.....	23
4.3 Uji Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder.....	26
BAB V PENUTUP	34
5.1 Simpulan.....	34
5.2 Saran.....	34
DAFTAR PUSTAKA.....	35
LAMPIRAN.....	39

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1 Kategori kekuatan daya hambat.....	8
3.1 Alat penelitian.	13
3.2 Bahan penelitian.	14
3.3 Pengukuran diameter zona hambat.....	17
4.2.1 Data spektrum UV-Vis isolat fraksi 1	20
4.2.2 Data spektrum UV-Vis isolat fraksi 2.....	21
4.2.3 Data spektrum UV-Vis isolat fraksi 3.....	21
4.2.4 Data spektrum UV-Vis isolat fraksi 4.....	22
4.2.5 Data spektrum UV-Vis isolat fraksi 5.....	22
4.3 Data pengukuran diameter zona hambat.....	23
4.4 Uji <i>One Way Anova</i>	25
4.5 Senyawa pada isolat fraksi ₄ daun tebu.	28

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Tebu (<i>Saccharum officinarum</i> L.) varietas NXI 1-3.....	5
2.2 Bakteri <i>S. aureus</i> dan koloni bakteri <i>S. aureus</i>	7
2.3 Kerangka berpikir.....	9
3.1 Alur penelitian.....	12
4.1 Hasil uji kemurniaan menggunakan plat TLC silika gel 60 F254.....	18
4.2.1 Spektrum isolat fraksi 1.....	20
4.2.2 Spektrum isolat fraksi 2.....	21
4.2.3 Spektrum isolat fraksi 3.....	21
4.2.4 Spektrum isolat fraksi 4.....	22
4.2.5 Spektrum isolat fraksi 5.....	22
4.3 Hasil uji antibakteri dengan isolat fraksi terduga tunggal terhadap bakteri <i>S. aureus</i>	24
4.4 Hasil uji antibakteri Ciprofloksasin dan Aquades terhadap bakteri <i>S. aureus</i>	24
4.5 Kromatogram isolat fraksi ke-4 daun tebu.....	26
4.6 Struktur kimia senyawa flavon, flavanon, flavonol.....	31

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Uji statistik	39
2. Spektrum isolat fraksi ke-4 pada uji LC-MS	41
3. Dokumentasi penelitian.	53

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Staphylococcus aureus adalah bakteri gram positif, non motil, non spora, anaerob fakultatif. *S. aureus* memiliki karakteristik mampu menghasilkan beberapa toksin dan faktor virulensi seperti mampu memproduksi koagulase, nuklease serta deoksiribonuklease (DNase) (Karimela *et al.*, 2017). Bakteri ini adalah salah satu organisme patogen yang umum ditemukan menginfeksi tubuh manusia. *S. aureus* adalah penyebab utama penyakit pada kulit, saluran pernafasan, tulang, endovaskuler dan keracunan makanan (Yuliani *et al.*, 2011).

Saat ini terjadi masalah resistensi bakteri *S. aureus* terhadap beberapa jenis antibiotik (*Multi Drug Resistance*) salah satunya adalah *penicillin*. Peningkatan resistensi bakteri terhadap antibiotik mendorong adanya upaya untuk memanfaatkan senyawa antibakteri dari bahan alam. Antibakteri adalah suatu senyawa yang digunakan untuk menghambat bakteri. Antibakteri biasanya terdapat dalam suatu organisme sebagai metabolit sekunder (Septiani *et al.*, 2017). Salah satu bahan alam yang diduga mengandung senyawa antibakteri terhadap bakteri *S. aureus* adalah daun tebu.

Tebu (*Saccharum officinarum*) adalah tanaman penghasil gula utama di Indonesia. Kebutuhan konsumsi gula semakin tinggi dikarenakan meningkatnya jumlah penduduk, pendapatan masyarakat dan pertumbuhan industri pengolahan makanan dan minuman (Shodiq, 2018). Luas area perkebunan tebu sekitar 420,15 ribu hektar pada tahun 2017. Sentra produksi tebu di Indonesia pada tahun 2012 hingga 2016 adalah Provinsi Jawa Timur dengan rata-rata produksi mencapai 1.283.810 ton atau 49,14% produksi tebu nasional (Indrati, 2016).

Tebu sebagai salah satu komoditi penting sub sektor perkebunan dengan nilai kebutuhan industri yang tinggi memberikan dampak melimpahnya produk samping tebu yang apabila tidak dimanfaatkan dengan baik akan menjadi limbah dan menimbulkan pencemaran lingkungan. Produk samping dari tebu meliputi

daun, abu, blotong dan *molasse*. Jumlah terbanyak produk samping tebu adalah *klentekan*, yaitu daun tebu yang dilepas karena sudah tua sebanyak 3-4 lembar saat tanaman tebu berumur 4, 6 dan 8 bulan (Ditjenbun, 2013). Upaya pemanfaatan *klentekan* yaitu dengan memanfaatkannya menjadi pakan ternak dengan kandungan nutrisi yang masih rendah. Tingginya kuantitas *klentekan* yang dihasilkan membuat perlu banyak inovasi dan teknologi tepat guna untuk memanfaatkan daun tebu yang sesuai dengan karakteristik kandungan senyawa bioaktif dalam daun tebu sehingga tidak hanya diolah sebagai pakan ternak.

Penelitian di Indonesia mengenai kandungan senyawa aktif daun tebu belum banyak dilakukan, namun pada penelitian Williams *et al.* (2016) disebutkan bahwa ekstrak batang tebu menunjukkan penghambatan pertumbuhan tertinggi pada bakteri *S. aureus* (8,67-24,00 mm) dibandingkan isolate bakteri *Escherichia coli* (8,67-15,33 mm) dan *Klebsiella pneumonia* (12,33-23,00 mm). Pada penelitian yang dilakukan oleh Pathak & Tiwari (2017) menunjukkan bahwa batang tebu memiliki beberapa senyawa aktif diantaranya tanin sebesar 0,2588 mg/ml, karbohidrat sebesar 2,1491 mg/ml, alkaloid sebesar 46,2566 mg/ml dan flavonoid sebesar 43, 6292 mg/ml. Senyawa aktif yang terdapat pada daun tebu tidak jauh berbeda dengan batang tebu diantaranya daun tebu mengandung beberapa senyawa flavonoid yaitu luteolin-8-C- (rhamnosylglucoside), diosmetin-8-C-glucoside, vitexin, orientin, tricetin-7-O- neohesperidoside, tricetin-4'-O- (erythro or threoguaicylglycerol) ether-7-O- glucopyranoside, tricetin-4'-O- (erythro or threoguaicylglycerol) ether (Vila *et al.*, 2008). Daun tebu juga mengandung senyawa fenolik yang bersifat desinfektan (Moodley & Gueguim, 2015). Berbagai penelitian yang telah dilakukan terhadap senyawa aktif yang terkandung pada batang dan daun tebu menunjukkan terdapat beberapa senyawa aktif yang sama sehingga diduga pada daun tebu terdapat senyawa antibakteri seperti pada batang tebu.

Pemanfaatan senyawa dalam batang tebu sebagai antibakteri telah banyak dilakukan. Namun demikian, pemanfaatan daun tebu sebagai antibakteri masih belum banyak diteliti. Oleh karena itu, uji terkait senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada daun tebu untuk menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus*

yang telah mengalami resistensi terhadap beberapa antibiotik penting untuk dilaksanakan. Penelitian yang lebih mendalam harus dapat menunjukkan senyawa spesifik yang fungsional yang dapat diperoleh dengan cara mengisolasi fraksi dari ekstrak daun. Penelitian ini dilakukan dalam 3 tahap uji. Uji yang pertama yaitu uji kemurnian yang bertujuan untuk mendeteksi isolat fraksi dari ekstrak daun tebu yang terduga tunggal dengan penanda berupa hanya memiliki satu noktah secara uji kromatografi lapis tipis dan memiliki puncak relatif tunggal pada spektrofotometri, uji yang kedua yaitu uji antibakteri untuk melihat aktivitas antibakteri dari isolat fraksi terduga tunggal melalui diameter zona hambat dan uji yang ketiga yaitu identifikasi senyawa metabolit sekunder pada isolat fraksi terduga tunggal yang memiliki aktivitas antibakteri.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah terdapat isolat fraksi terduga tunggal berdasarkan kromatografi lapis tipis dan spektrofotometri pada ekstrak daun tebu ?
2. Apakah isolat fraksi terduga tunggal dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* ATCC 25923?
3. Senyawa apakah yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *S. aureus* ATCC 25923 pada isolat fraksi terduga tunggal ?

1.3 Penegasan Istilah

Beberapa istilah yang perlu ditegaskan adalah sebagai berikut :

1. Isolat fraksi daun tebu

Daun tebu yang digunakan dalam penelitian adalah daun dari tebu varietas NXI 1-3 yang telah berusia 11 bulan yang ditanam di sekitar pabrik gula Rendeng, Kudus. Daun yang digunakan adalah 5 helai daun terbawah dari tanaman tebu. Daun tersebut lalu dikeringkan dan diekstrak dengan menggunakan pelarut etanol PA 96%. Ekstrak lalu difraksinasi menggunakan kromatografi kolom dengan eluen terdiri dari n-heksana dan etil asetat yang diperlakukan dalam 7 komposisi perbandingan. Isolat fraksi yang terdeteksi tunggal melalui KLT dan spektrofotometri serta memiliki aktivitas antibakteri kemudian diidentifikasi jenis senyawanya dengan LCMS.

2. Penghambatan pertumbuhan

Penghambatan pertumbuhan bakteri dilakukan dengan metode difusi cakram dengan cara cakram direndam dalam isolat fraksi terduga tunggal, antibiotik dan aquades. Ukuran penghambatan diambil dengan mengukur diameter zona bening disekitar cakram pada media pertumbuhan bakteri setelah 24 jam inkubasi. Satuan ukuran yang digunakan adalah mm.

3. Bakteri *Staphylococcus aureus*

Bakteri *S. aureus* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro (Undip) dengan strain ATCC 25923. Kultur murni ditumbuhkan di *Blood Agar*, sementara kultur untuk uji antibakteri dilakukan pada medium *Mueller Hinton Agar*.

1.4 Tujuan Penelitian

1. Mendeteksi isolat fraksi terduga tunggal berdasarkan kromatografi lapis tipis dan spektrofotometri pada ekstrak daun tebu.
2. Menganalisis kemampuan isolat fraksi terduga tunggal untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
3. Menganalisis senyawa yang terdapat pada isolat fraksi terduga tunggal yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

1.5 Manfaat Penelitian

1. Memberikan informasi kepada instansi kesehatan untuk memanfaatkan isolat fraksi daun tebu sebagai bahan alam penghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.
2. Memberikan informasi kepada masyarakat dalam bentuk kajian pustaka mengenai pengolahan daun tebu sebagai bahan alam penghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 TinjauanPustaka

2.1.1 Tebu (*Saccharum officinarum* L.)

Tebu adalah tanaman perdu yang tergolong ke dalam suku *Poaceae* (rumput - rumputan), yang tumbuh subur di daerah tropis dan subtropis (Verheye, 2010). Tebu memiliki tingkat keragaman varietas yang tinggi. Setiap varietas memerlukan kondisi tertentu dalam pengelolaanya. Pada varietas tanaman tebu terus dilakukan pengembangan untuk meningkatkan mutu dan dalam upaya pemenuhan produksi gula dalam negeri (Alfianet *al.*, 2015). Salah satu varietas tebu (*Saccharum officinarum*) adalah tebu varietas NXI 1-3.



Gambar 2.1 Tebu (*Saccharum officinarum* L.) varietas NXI 1-3
Sumber : Litbang Induk, 2012

Tebu varietas NXI 1-3 adalah tanaman tebu varietas unggul baru dari hasil penelitian PT. Perkebunan Nusantara XI (PTPN XI) (Litbang Induk, 2012). Tanaman tebu varietas NXI 1-3 memiliki beberapa keunggulan antara lain produktivitas tinggi, daya tahan keprasan tinggi, mudah beradaptasi dengan lingkungan dan dapat bereproduksi baik meski ditanam pada lahan tegalan (Alfian *et al.*, 2015).

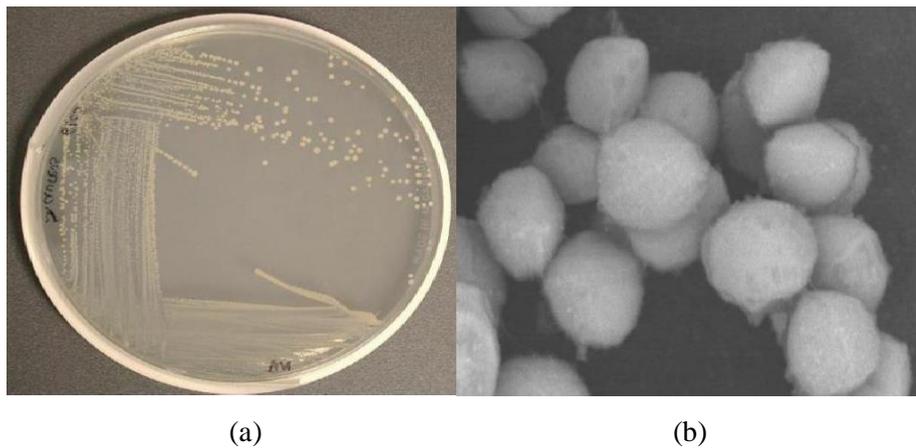
Tanaman tebu termasuk dalam golongan C4 yang memiliki kemampuan memanfaatkan radiasi surya dalam laju fotosintesis yang tinggi (Mastur, 2016). Pada tanaman C4 terdapat 2 tipe sel yang memiliki fungsi untuk fotosintesis yaitu mesofil dan seludang ikatan pembuluh yang lebih dikenal dengan anatomi Kranz. Proses fotosintesis menghasilkan metabolit primer yang digunakan untuk metabolisme tanaman serta untuk menyusun metabolit sekunder yang mendukung pada proses adaptasi dan proteksi tanaman (Haryanti, 2008). Tingginya laju fotosintesis pada tanaman tebu memberikan potensi tingginya kandungan metabolit sekunder yang dapat dimanfaatkan untuk kesejahteraan manusia salah satunya adalah sebagai antibakteri.

Di Indonesia belum banyak dilakukan penelitian terkait kandungan tanaman tebu khususnya pada daun tebu sebagai produk samping yang melimpah untuk dimanfaatkan sebagai antibakteri, namun pada penelitian William *et al.* (2016) menunjukkan ekstrak batang tebu memiliki penghambatan pertumbuhan tertinggi pada bakteri *S. aureus* (8,67-24,00 mm) dibandingkan isolat bakteri *Escherichia coli* (8,67-15,33 mm) dan *Klebsiella pneumonia* (12,33- 23,00 mm). Adapun kandungan senyawa aktif pada batang tebu diantaranya tannin sebesar 0,2588 mg/ml, karbohidrat sebesar 2,1491 mg/ml, alkaloid sebesar 46,2566 mg/ml dan flavonoid sebesar 43, 6292 mg/ml (Pathak & Tiwari, 2017).

Daun tebu mengandung senyawa fenolik dan terpenoid yang tinggi. Fenol adalah senyawa yang bersifat desinfektan yang bekerja dengan cara mendenaturasi protein yang berperan dalam aktivitas metabolisme sehingga sel bakteri akan mati (Sari *et al.*, 2018). Beberapa senyawa flavonoid juga terkandung dalam daun tebu yaitu luteolin-8-*C*-(rhamnosylglucoside), diosmetin-8-*C*-glucoside, vitexin, orientin, tricetin-7-*O*-neohesperidoside, tricetin-4'-*O*-(erythro or threoguaicylglycerol) ether-7-*O*-glucopyranoside, tricetin-4'-*O*-(erythro or threoguaicylglycerol) ether (Vila *et al.*, 2008). Berbagai kandungan senyawa aktif yang terdapat pada daun tebu diduga memiliki aktivitas antibakteri seperti pada batang tebu sehingga dirasa perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai kandungan senyawa aktif daun tebu sebagai antibakteri untuk mengoptimalkan potensi daun tebu.

2.1.2 Bakteri *Staphylococcus aureus*

S. aureus adalah bakteri gram positif berbentuk bulat, berdiameter 0,7 - 1,2 μm , tersusun dalam kelompok yang tidak teratur seperti buah anggur, fakultatif anaerob, tidak membentuk spora, dan tidak bergerak (Rahmi *et al.*, 2015). Bakteri *S. aureus* dapat menyebabkan infeksi invasif seperti bakteremia, endokarditis, pneumonia, dan osteomielitis (Hazenboset *et al.*, 2017). Infeksi serius dari bakteri dapat terjadi saat sistem imun melemah yang dapat disebabkan oleh perubahan hormon, penyakit, luka, dan penggunaan steroid atau pengobatan lain yang mempengaruhi imunitas.



Gambar 2.2 (a) Bakteri *S. aureus* (b) Koloni bakteri *S. aureus*
 Sumber : (a) Mamza *et al.*, 2016 (b) Harris *et al.*, 2002

Bakteri *S. aureus* memiliki beberapa toksin ekstraseluler diantaranya enterotoksin A-E, toksin sindrom syok toksik 1 (TSST-1), dan eksfoliatif A dan B yang dapat menginfeksi manusia (Harris *et al.*, 2002). Pengobatan yang diberikan pada pasien yang terinfeksi bakteri adalah antibiotik, namun saat ini terdapat permasalahan resistensi bakteri *S. aureus* terhadap antibiotik. Hal ini dikarenakan *S. aureus* memiliki protein berupa enzim β -laktamase yang juga dikenal sebagai penisilinase. Produksi β -laktamase berfungsi untuk melindungi *S. aureus* untuk melawan penisilin. Enzim β -laktamase berfungsi menghidrolisis ikatan β -laktam yang menyebabkan antibiotik tersebut tidak bekerja.

Resistensi bakteri *S. aureus* terhadap antibiotik adalah permasalahan penting. Penggunaan antibiotik dengan pertimbangan yang kurang tepat dapat mengakibatkan resistensi obat, meningkatkan morbiditas, mortalitas dan biaya pengobatan (Jamilatun, 2019). Adanya permasalahan resistensi bakteri *S. aureus* terhadap antibiotik mendorong perlu dilaksanakan penelitian untuk mendapatkan senyawa dari bahan alam yang memiliki manfaat sebagai antibakteri.

2.1.3 Antibakteri

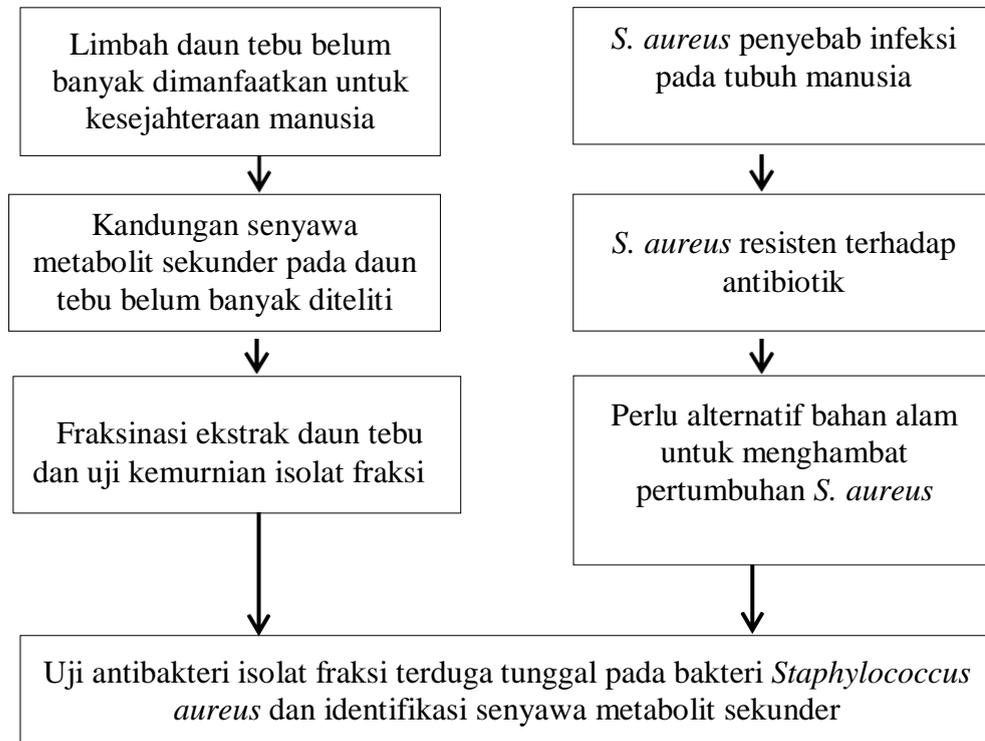
Antibakteri adalah suatu senyawa yang digunakan untuk menghambat bakteri. Pada penelitian yang umum dilakukan, aktivitas penghambatan bakteri dapat dilihat dari diameter zona hambat yang terbentuk. Adapun kategori zona hambat disajikan pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Kategori kekuatan daya hambat

Diameter (mm)	Kekuatan daya hambat
≤ 5	Lemah
6-10	Sedang
11-20	Kuat
≥ 21	Sangat kuat

Hasil penelitian Taleb *et al.* (2016) menyatakan bahwa terdapat senyawa fitokomia yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* yaitu fenol. Fenol akan menginduksi stress oksidatif pada bakteri *S. aureus*. Menurut Septiani *et al.* (2017) tanin juga memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* dikarenakan senyawa tannin bersifat polar sehingga dapat lebih mudah menembus lapisan peptidoglikan. Selain senyawa tanin yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus*, terdapat senyawa lain yaitu senyawa flavonoid, fenolik, dan terpenoid. Senyawa flavonoid dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* melalui penghambatan DNA *gyrase*, sehingga menghambat fungsi membran sitoplasma. Senyawa fenolik menyebabkan lisis komponen seluler serta merusak mekanisme enzimatik sel bakteri. Senyawa terpenoid berperan sebagai antibakteri dengan melibatkan pemecahan membran oleh komponen-komponen lipofilik (Octaviani *et al.*, 2019).

2.2 Kerangka Berpikir



Gambar 2.3 Kerangka berpikir

2.3 Hipotesis

1. Terdapat isolat fraksi terduga tunggal pada ekstrak daun tebu.
2. Isolat fraksi terduga tunggal dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
3. Terdapat senyawa pada isolat fraksi terduga tunggal yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Tempat penelitian :

1. Laboratorium Fisiologi Tumbuhan, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Semarang. : kegiatan yang dilaksanakan adalah ekstraksi serbuk daun tebu, fraksinasi ekstrak daun tebu dan uji kemurnian isolat fraksi dengan KLT.
2. Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Semarang : kegiatan yang dilaksanakan adalah uji kemurnian isolat fraksi dengan spektrofotometri.
3. Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro : kegiatan yang dilaksanakan adalah uji antibakteri.

Waktu penelitian : Oktober 2019 – Juli 2020 .

3.2 Subjek Penelitian

Penelitian ini melakukan 3 uji yaitu (1) uji kemurnian dengan populasi adalah ekstrak daun tebu dan sampel adalah isolat fraksi daun tebu dari berbagai komposisi eluen n-heksana dan etil asetat, (2) uji anti bakteri dengan populasi adalah bakteri *S. aureus* dan sampel adalah *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, serta (3) uji identifikasi senyawa metabolit sekunder dengan populasi adalah isolat fraksi daun tebu dan sampel adalah isolat fraksi daun tebu terduga tunggal yang memiliki aktivitas antibakteri.

3.3 Variabel Penelitian

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dari uji pertama (uji kemurnian) adalah isolat fraksi daun tebu dari berbagai komposisi eluen n-heksana dan etil asetat yang ditandai dengan penomoran yaitu F₁, F₂, F₃, F₄, F₅. Variabel bebas dari uji kedua (uji antibakteri) adalah isolat fraksi daun tebu terduga tunggal. Variabel bebas dari uji ketiga (uji identifikasi senyawa metabolit sekunder) adalah isolat fraksi daun tebu terduga tunggal yang memiliki aktivitas antibakteri.

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada uji pertama (uji kemurnian) adalah noktah pada kromatogram dan puncak pada spektrofotometri. Variabel terikat pada uji kedua (uji antibakteri) adalah diameter zona hambat dengan satuan milimeter (mm). Variabel terikat pada uji ketiga (uji identifikasi senyawa metabolit sekunder) adalah senyawa metabolit yang ditemukan berdasarkan LC-MS.

3.3.3 Variabel Kendali

Variabel kendali pada uji pertama (uji kemurnian) adalah komposisi eluen heksana dan etil asetat, UV 365 nm untuk mengamati noktah pada KLT, serapan panjang gelombang 200 – 900 nm untuk melihat puncak pada spektrofotometri. Variabel kendali pada uji kedua (uji antibakteri) adalah media pertumbuhan bakteri yaitu *Blood Agar*, suhu inkubasi 34⁰C dan waktu inkubasi 24 jam. Variabel kendali pada uji ketiga (uji identifikasi senyawa metabolit sekunder) adalah jumlah injeksi sampel pada LC-MS 1µl, temperatur kolom LC-MS 35⁰C, eluen berupa H₂O dan etanol 90%.

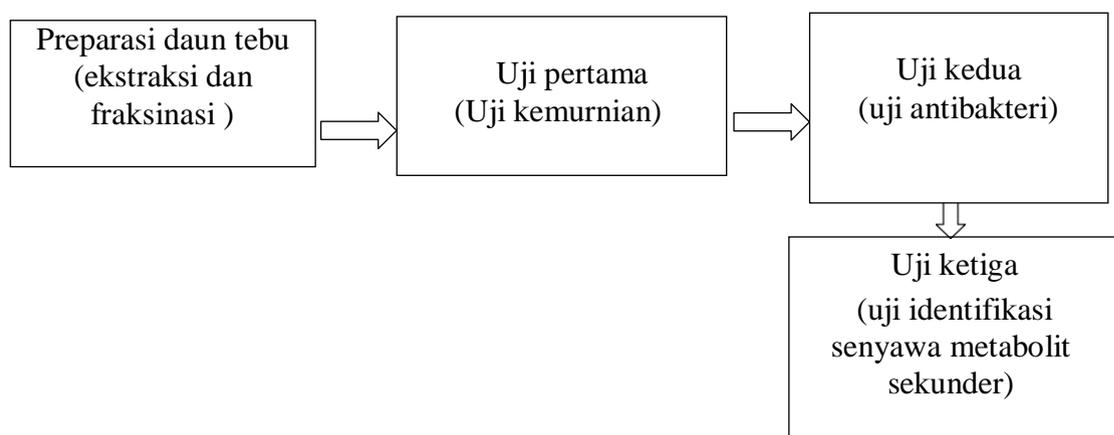
3.4 Rancangan Penelitian

Pada uji pertama (uji kemurnian), pendekatan penelitian yang dilakukan adalah kualitatif. Pendekatan ini dilakukan dengan cara menganalisis jumlah noktah pada kromatogram untuk masing – masing isolat fraksi yang diperoleh dari kromatografi kolom dan jumlah puncak pada spektrofotometri. Isolat fraksi yang hanya memiliki 1 puncak dan 1 noktah selanjutnya dideteksi sebagai isolat fraksi terduga tunggal.

Pada uji kedua (uji antibakteri), rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dan uji statistik *one-way anova* untuk mencapai tujuan menganalisis kemampuan isolat fraksi terduga tunggal dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* ATCC 25923. Perlakuan yang diberikan berupa menganalisis data ukuran diameter zona hambat dari beberapa isolat fraksi terduga tunggal, antibiotik Ciprofloksasin dan aquades. Jika terdapat hasil beda nyata pada data, akan dilakukan uji lanjut Tukey.

Pada uji ketiga (uji identifikasi senyawa metabolit sekunder), pendekatan penelitian juga dilakukan secara kualitatif untuk mendeteksi jenis – jenis senyawa yang ditemukan dalam isolat fraksi terduga tunggal yang memiliki aktivitas antibakteri. Analisis identifikasi metabolit sekunder dilakukan dengan *liquid chromatography – mass spectrometry* (LCMS). Pada tahap akhir, dilakukan analisis fungsi kandungan senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri secara literatur.

3.4.1 Alur Penelitian



Gambar 3.1 Alur penelitian

3.5 Alat dan Bahan Penelitian

3.5.1 Alat Penelitian

Tabel 3.1 Alat penelitian

No.	Alat	Fungsi	Spesifikasi
1.	Pipet tetes	Meneteskan larutan	Iwaki pyrex
2.	Tabung reaksi	Wadah larutan	Iwaki pyrex
3.	Neraca analitik	Menimbang bahan	Radwag AS 220 R2
4.	Cawan petri	Tempat media bakteri	Labware
5.	Blender	Menghomogenkan sampel	Panasonic
6.	Kain saring	Menyaring larutan	-
7.	Beaker glas	Wadah larutan atau bahan	Iwaki pyrex
8.	Alumunium foil	Menutup alat-alat gelas	Klinpak
9.	Kromatografi kolom	Memurnikansenyawa dari Campuran	Iwaki pyrex
10.	Mikropipet	Mengambil larutan dalam volume kecil	Dragon med
11.	Rotary evaporator	Menguapkan larutan	IKA RV10 Digital V
12.	Erlenmeyer	Wadah menyimpan larutan	Iwaki pyrex
13.	Stirrer	Menghomogenkan sampel	Scilogex
14.	Pengaduk	Mengaduk larutan	Sellaco
15.	Bunsen	Menjaga kondisi aseptis saat Inokulasi	JSFULL
16.	Autoklaf	Membunuh mikroorganisme di alat dan media	Sanyo
17.	Rak tabung reaksi	Meletakkan tabung reaksi	-
18.	Spektrofotometer	Menguji kemurnian fraksi	Perkin-Elmer lambda 25
19.	Vortex	Menghomogenkan larutan	Boeco-Germany
20.	LC-MS	Mengkarakterisasi struktur senyawa isolat fraksi	Shimadzu LC-MS
21.	Lampu UV	Menganalisis jumlah noktah	

3.5.2 Bahan Penelitian

Tabel 3.2 Bahan penelitian

No.	Bahan	Fungsi	Spesifikasi
1.	Etanol 96%	Pelarut ekstraksi daun tebu	Merck 1.00983.2500
2.	Aquades	Pelarut	Shagufta Laboratory
3.	Mc Farland	Mensetarakan jumlah bakteri	Himedia R092-1NO
4.	Blood Agar	Media pertumbuhan bakteri	Merck 10886.0500
5.	MHA	Media untuk menguji daya hambat bakteri	Merck 1.05437.0500
6.	Ekstrak daun tebu	Sampel untuk fraksinasi	-
7.	Antibiotik	Variabel kontrol pada pertumbuhan bakteri	Ciprofloksasin
8.	n-Heksana	Fase gerak pada metode kromatografi kolom	Merck1.04367.2500
9.	Etil asetat	Fase gerak pada metode kromatografi kolom	Merck1.09623.2500
10.	Silika gel 60 GF ₂₅₄	Fase diam pada metode kromatografi kolom	Merck 1.07730.0500
11.	NaCl fisiologis 0.9%	Media untuk pengenceran bakteri	Otsu-NS

3.6 Prosedur Penelitian

1. Preparasi sampel

a. Ekstraksi

200 gram daun tebu dibersihkan dan dikeringkan secara kering angin pada suhu ruangan yang berkisar 27⁰C, kemudian dihaluskan dengan cara digiling dan diayak dengan ayakan 100 mesh sehingga mendapatkan partikel serbuk daun berukuran diameter 0,15 mm. 100 gram serbuk daun tebu dimaserasi dengan cara direndam dalam 1 liter etanol PA 96% selama 1 x 24 jam. Larutan kemudian disaring dengan kertas whattman kelas 4 dengan ukuran diameter pori 90 mm untuk memisahkan antara filtrat dan residu. Prosedur maserasi ini diulangi secara triplo untuk residu yang sama. Ekstrak yang diperoleh diuapkan

dan diencerkan kembali dengan etanol PA 96% dengan perbandingan 1 : 100 untuk tahap fraksinasi dengan kromatografi kolom.

b. Kromatografi kolom

Kromatografi kolom dilakukan dengan menggunakan kolom pyrex dengan fase diam yang digunakan yaitu 30 gram silika gel 60 GF₂₅₄, sedangkan fase gerak atau eluen yaitu n-heksana PA dan etil asetat PA yang diterapkan secara bertingkat. Perbandingan eluen yang digunakan adalah sebagai berikut :

- a. 100 ml n-heksana
- b. 90 ml n-heksana : 10 ml etil asetat
- c. 70 ml n-heksana : 30 ml etil asetat
- d. 50 ml n-heksana : 50 ml etil asetat
- e. 30 ml n-heksana : 70 ml etil asetat
- f. 10 ml n-heksana : 90 ml etil asetat
- g. 100 ml etil asetat

Dari perbandingan eluen yang telah ditentukan, maka fraksi yang keluar ditampung per 10 ml dalam, kemudian tiap fraksi diuapkan dan dilarutkan ke dalam 10 ml aquades.

2. Uji laboratoris untuk memenuhi tujuan penelitian

a. Uji kemurnian

Kemurnian tiap isolat fraksi diuji dengan KLT dan spektrofotometri. Uji KLT dilakukan dengan mengaplikasikan 1 tetes sampel dari masing – masing isolat fraksi ke 1 cm dari pangkal pelat TLC silika gel 60 GF₂₅₄. Selanjutnya, pangkal pelat tersebut direndam dalam n-heksan dan etil asetat. Proses kapilaritas eluen dibiarkan dalam waktu tertentu hingga eluen tampak telah sampai pada ujung pelat. Pelat basah dikeringanginkan dan diletakkan di bawah lampu UV untuk menganalisis jumlah noktah. Uji spektrofotometri dilakukan dengan cara melakukan pancaran cahaya dari jangkauan panjang gelombang 200 – 900 nm untuk setiap isolat fraksi secara bergantian. Pancaran cahaya yang tampak dalam bentuk puncak – puncak lalu dianalisis untuk menentukan isolat fraksi yang diduga hanya memiliki 1 jenis senyawa.

b. Uji antibakteri

Perlakuan uji antibakteri dilakukan dengan menguji isolat fraksi terduga tunggal dari hasil uji KLT dan spektrofotometri dengan urutan perlakuan dari fraksi pertama hingga fraksi kelima terhadap biakan *S. aureus*. Kontrol positif yang digunakan yaitu ciprofloksasin 5 µg/ml, sedangkan control negatif yaitu aquades. Isolat fraksi daun tebu diujikan ke biakan bakteri *S. aureus* pada media MHA. Jumlah bakteri dalam biakan telah diseragamkan terlebih dahulu dengan metode MC Farland 0,5. Uji aktivitas antibakteri dilakukan menggunakan metode difusi cakram dengan cara merendam masing-masing *blank disk* antibiotik Oxoid selama \pm 1 jam di dalam isolat fraksi terduga tunggal, antibiotik ciprofloksasin 5 µg/ml, dan aquades sesuai dengan yang akan diujikan, kemudian biakan *S. aureus* diratakan secara spread pada media MHA dengan menggunakan *cotton swab*, setelah *blank disk* direndam kemudian dibiarkankering dan diletakan secara teratur menggunakan pinset steril pada cawan petri yang terdapat media MHA dan biakan *S. aureus*. Tiap perlakuan diulangi 3 kali. Cawan petri tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 34⁰C selama 24 jam. Daya hambat diukur dalam bentuk diameter dengan satuan mm.

c. Identifikasi senyawa metabolit sekunder

Isolat fraksi terduga tunggal dan memiliki aktivitas antibakteri diidentifikasi kandungan metabolit sekunder yang spesifik menggunakan LC-MS. Prosedur kerja dimulai dengan cara menyaring isolat fraksi terduga tunggal yang teruji antibakteri dengan filter milipore. Isolat fraksi terduga tunggal lalu disuntikan sejumlah 1 µl pada LC-MS melalui kolom shimadzu shim pack FC-ODS (2 mm x 150 mm, 3 µm) dengan kecepatan alir 0,5 ml/min. Senyawa yang keluar terdeteksi dalam puncak kemudian dianalisis dengan NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*) untuk mengetahui strukturnya.

3.7 Analisis Data

Data yang dikumpulkan adalah :

1. Uji kemurnian:

Data yang diperoleh berupa beberapa hasil analisis noktah pada KLT dan puncak pada spektrofotometri. Isolat fraksi terduga tunggal jika memiliki 1 noktah pada KLT dan 1 puncak pada spektrofotometri. Isolat – isolat fraksi ini lalu disimpan untuk digunakan pada uji antibakteri.

2. Uji Antibakteri:

Data berupa matriks yang terdapat hasil pengukuran diameter zona hambat masing – masing isolat fraksi terduga tunggal dengan satuan mm.

Tabel 3.3 Pengukuran diameter zona hambat

Ulangan \ Sampel	Diameter zona hambat (mm)						
	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅	Ciprofloksasin	Aquades
U ₁							
U ₂							
U ₃							
Rata-rata							

3. Uji identifikasi senyawa metabolit sekunder

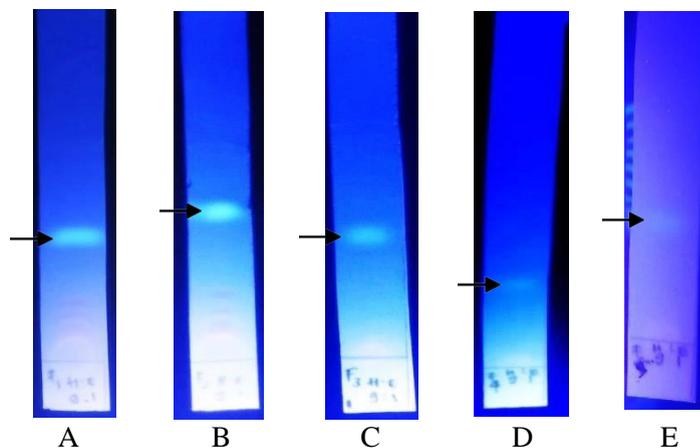
Data yang diperoleh berupa senyawa-senyawa yang terdeteksi dari LCMS yang kemudian dianalisis secara deskriptif untuk mengetahui senyawa mana sajakah yang memiliki kemampuan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus*.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Uji Kemurnian

Senyawa-senyawa yang terkandung dalam ekstrak daun tebu dipisahkan menggunakan kromatografi kolom, sedangkan kemurniannya diuji menggunakan kromatografi lapis tipis dan spektrofotometri. Kromatografi adalah teknik pemisahan campuran berdasarkan perbedaan kecepatan perambatan komponen dalam media tertentu (Syahmani *et al.*, 2017). Pada hasil kromatografi kolom diperoleh 35 vial dengan perbandingan eluen tertentu yang masing-masing diuji kemurniannya menggunakan plat TLC silika gel 60 F₂₅₄ dan spektrofotometer.



Gambar 4.1 Hasil uji kemurniaan menggunakan plat TLC silika gel 60 F₂₅₄
Keterangan : A menunjukan fraksi 1, B fraksi 2, C fraksi 3,
D fraksi 4, E fraksi 5

Dari 35 vial tersebut, ditemukan hanya 5 isolat fraksi saja yang memiliki noktah tunggal sebagaimana terdapat pada gambar 4.1. Kelima isolat ini diperoleh dari hasil fraksinasi eluen n-heksana : etil asetat dengan perbandingan 90 : 10. Perbandingan eluen tersebut menghasilkan pemisahan noktah pada fraksi pertama hingga fraksi kelima.

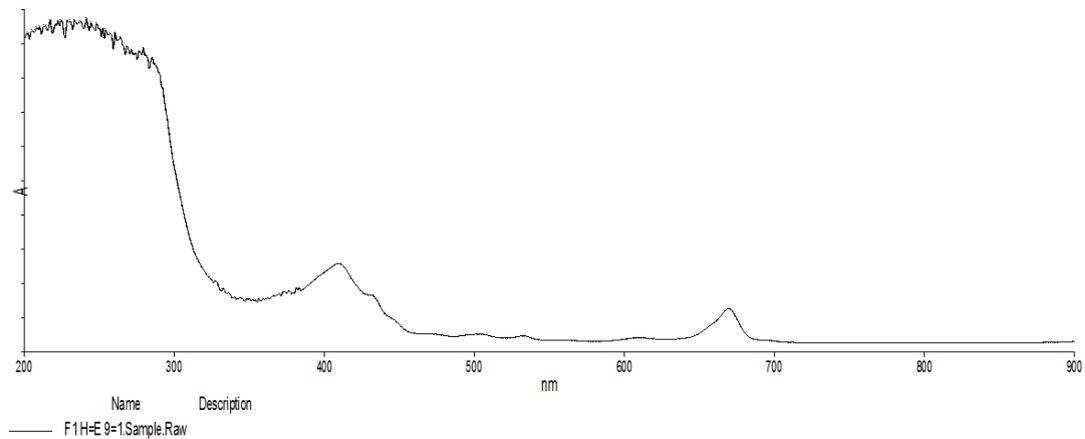
Pada gambar 4.1 terlihat bahwa hanya terbentuk 1 noktah yang jelas dan terpisah dengan baik pada plat TLC silika gel 60 F₂₅₄ dari isolat pertama hingga kelima sehingga dapat dikatakan bahwa telah didapatkan isolat fraksi terduga

tunggal. Ridwanuloh & Syarif (2019) menyatakan bahwa jika senyawa yang diuji dengan KLT memberikan noktah tunggal, maka senyawa hasil isolasi telah murni karena pada fase gerak yang berbeda kepolarannya, semua isolat fraksi masing-masing hanya menghasilkan satu noktah saja.

Prinsip analisis uji kemurnian isolat fraksi menggunakan KLT adalah berdasarkan adsorpsi dan partisi yang ditentukan oleh fase diam (adsorben) dan fase gerak (eluen). Komponen-komponen kimia dalam suatu isolat fraksi tidak sama sehingga komponen kimia dapat bergerak dengan jarak yang berbeda berdasarkan tingkat kepolarannya (Alen *et al.*, 2017). Hal ini yang menyebabkan terjadinya pemisahan komponen kimia di dalam ekstrak. Fase diam yang digunakan pada uji kemurnian adalah silika. Silika sebagai fase diam memiliki gugus aktif bersifat polar yaitu gugus silanol (Si-OH), sehingga berbagai senyawa yang bersifat polar akan tertahan pada silika, sedangkan untuk fase geraknya menggunakan perbandingan eluen n-heksana : etil asetat (9 : 1). N-heksana adalah jenis pelarut yang bersifat nonpolar sehingga n-heksana dapat melarutkan senyawa nonpolar (Romadonu *et al.*, 2014). Etil asetat adalah pelarut yang bersifat semi polar sehingga dapat melarutkan senyawa semi polar (Romadonu *et al.*, 2014). Tanaya *et al.* (2015) menyatakan bahwa pelarut n-heksana dapat digunakan untuk melarutkan senyawa nonpolar seperti lemak, sterol, kumarin, dan beberapa senyawa terpenoid, sedangkan pelarut etil asetat dapat digunakan untuk melarutkan senyawa semi polar seperti flavonoid, tanin, fenol.

Uji kemurnian isolat fraksi daun tebu selanjutnya dikonfirmasi dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 200-900 nm untuk dapat memastikan kemurnian isolat fraksi terduga tunggal. Data spektrum UV-Vis isolat fraksi terduga tunggal disajikan pada Gambar 4.2.1 – 4.2.5.

A. Isolat Fraksi 1

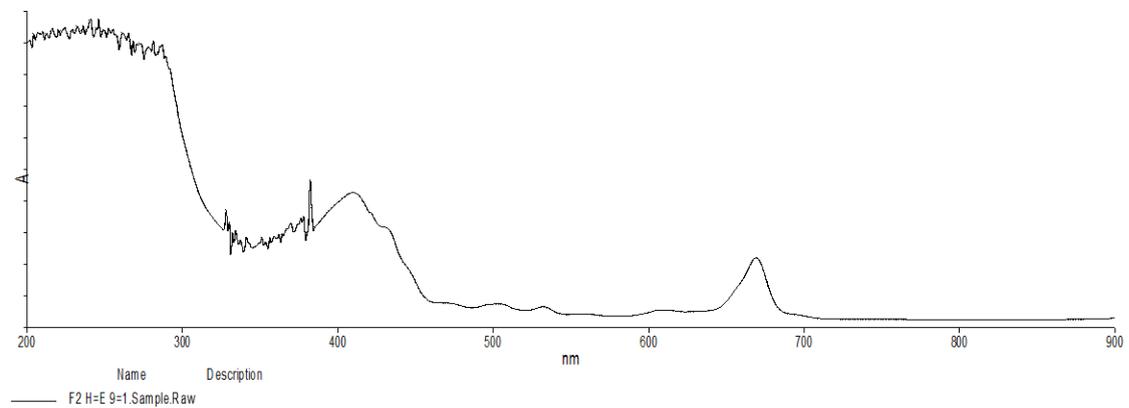


Gambar 4.2.1 Spektrum isolat fraksi

Tabel 4.2.1 Data spektrum UV-Vis isolat fraksi 1

Isolat fraksi 1	Panjang gelombang (nm)	Absorbansi
Pita I	409	1,0139
Pita II	669	0,4613

B. Isolat Fraksi 2

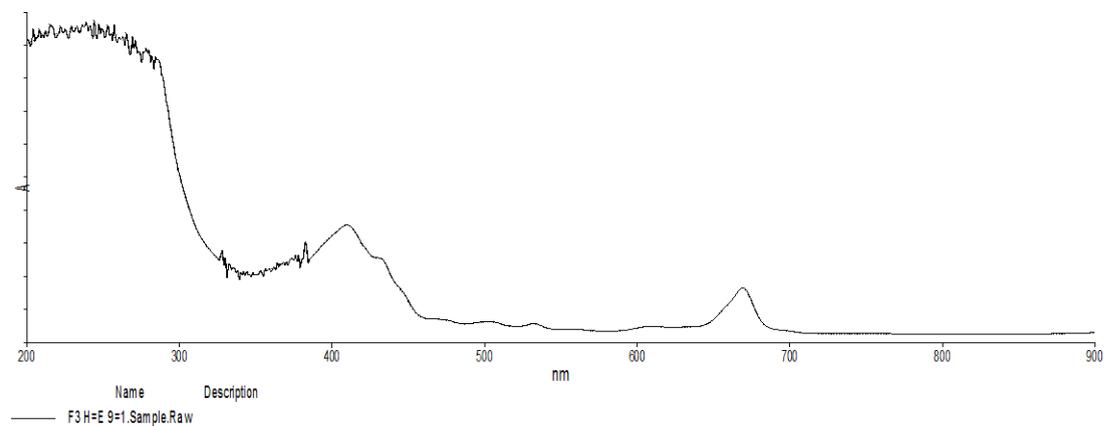


Gambar 4.2.2 Spektrum isolat fraksi 2

Tabel 4.2.2 Data spektrum UV-Vis isolat fraksi 2

Isolat fraksi 2	Panjang gelombang (nm)	Absorbansi
Pita I	410	1,7727
Pita II	669	0,8823

C. Isolat Fraksi 3

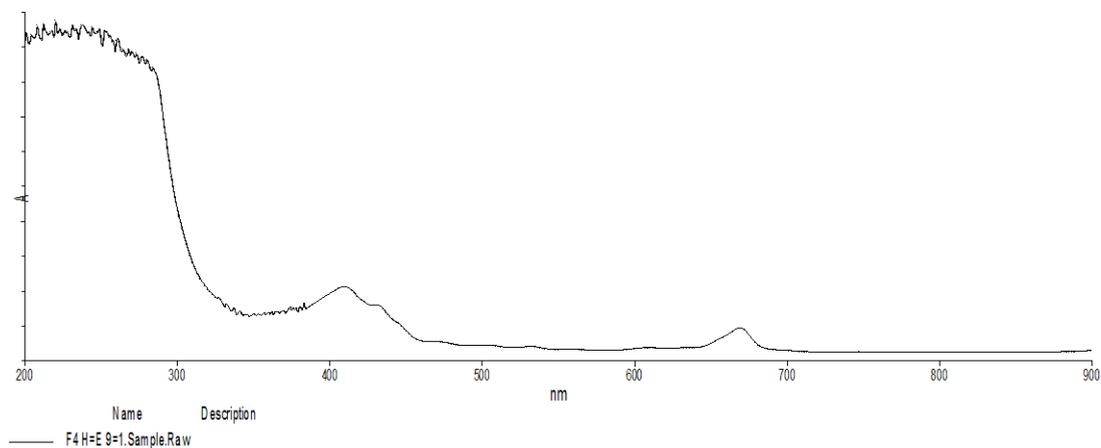


Gambar 4.2.3 Spektrum isolat fraksi 3

Tabel 4.2.3 Data spektrum UV-Vis isolat fraksi 3

Isolat fraksi 3	Panjang gelombang (nm)	Absorbansi
Pita I	410	1,4565
Pita II	669	0,6390

D. Isolat Fraksi 4

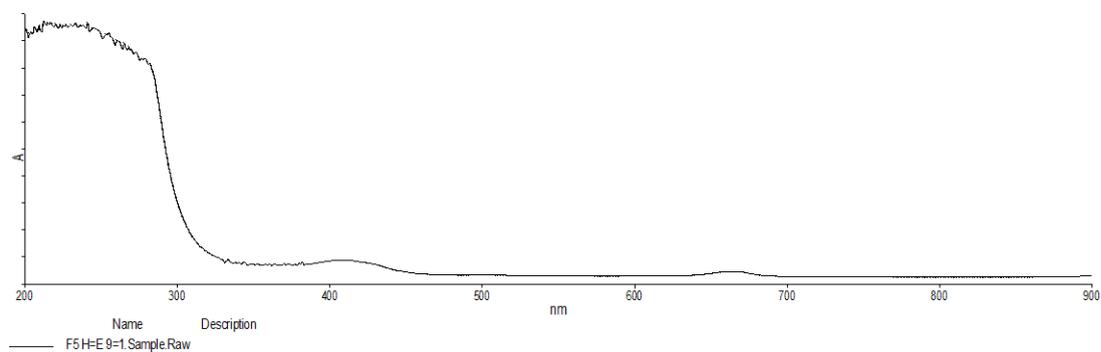


Gambar 4.2.4 Spektrum isolat fraksi 4

Tabel 4.2.4 Data spektrum UV-Vis isolat fraksi 4

Isolat fraksi 4	Panjang gelombang (nm)	Absorbansi
Pita I	409	0,8141
Pita II	669	0,3272

E. Isolat Fraksi 5



Gambar 4.2.5 Spektrum isolat fraksi 5

Tabel 4.2.5 Data spektrum UV-Vis isolat fraksi 5

Isolat fraksi 5	Panjang gelombang (nm)	Absorbansi
Pita I	408	0,2895
Pita II	665	0,1187

Dari data yang diperoleh berdasarkan spektrum yang disajikan pada gambar 4.2.1 - 4.2.5 diketahui terdapat dua serapan panjang gelombang. Pada pita I dengan rentang serapan 408-410 nm yang diperkirakan adalah senyawa tertentu yang diduga memiliki aktivitas antibakteri. Serapan pada panjang gelombang 408-410 nm tersebut diduga adalah pita serapan senyawa flavonoid, hal ini sesuai dengan sifat khas senyawa flavon yang memiliki serapan pada panjang gelombang maksimum 330-410 nm (Sitrait, 2007). Pada pita II dengan rentang serapan 665 – 669 nm diperkirakan adalah pigmen klorofil. Klorofil banyak menyerap sinar dengan panjang gelombang antara 400 – 700 nm (Mil *et al.*, 2017). Pigmen ini memang agak susah dipisahkan dari ekstrak daun karena pigmen klorofil adalah senyawa terbanyak dalam daun. Namun demikian, dengan melihat absorbansi yang lebih kecil daripada pita I, maka diduga tidak akan terlalu mempengaruhi efek fisiologis dari senyawa yang memberikan absorbansi pada pita I.

4.2 Uji Antibakteri

Uji antibakteri memiliki tujuan untuk dapat menganalisis aktivitas antibakteri dari isolat fraksi terduga tunggal. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat fraksi terduga tunggal memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus*. Hal tersebut dapat diamati berdasarkan terbentuknya zona hambat pada setiap cawan petri yang telah diberi perlakuan yang disajikan pada Tabel 4.3.

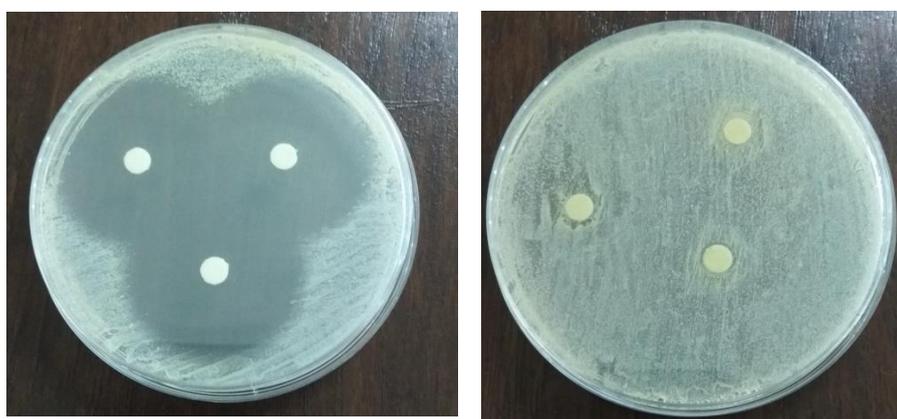
Tabel 4.3 Data pengukuran diameter zona hambat

Ulangan \ Sampel	Diameter zona hambat (mm)						
	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅	Ciprofloksasin	Aquades
U ₁	0	0	0	15	2	27,5	0
U ₂	2,5	4	5	14,5	2,5	27	0
U ₃	2	0	0	14	3	26	0
Rata-rata	1,5	1,3	1,7	14,5	2,5	26,8	0

Tabel 4.3 adalah hasil pengukuran dari diameter zona hambat isolat fraksi terduga tunggal terhadap bakteri *S. aureus*. Tabel tersebut menunjukkan bahwa isolat fraksi terduga tunggal yang memiliki aktivitas antibakteri tertinggi adalah isolat fraksi ke-4 (F₄) dengan diameter zona hambat sebesar 14,5 mm. Isolat fraksi ke-4 memiliki daya hambat yang kuat begitupula untuk antibiotik ciprofloksasin, sedangkan untuk isolat fraksi 1,2,3 dan 5 memiliki daya hambat yang lemah. Hal ini sesuai dengan kategori kekuatan daya hambat yang telah disajikan pada Tabel 2.1.



A B C
Gambar 4.3 Hasil uji antibakteri isolat fraksi terduga tunggal terhadap bakteri *S. aureus*,
Keterangan : A adalah ulangan 1, B ulangan 2, C ulangan 3



A B
Gambar 4.4 Hasil uji antibakteri (A) Ciprofloksasin, (B) Aquades terhadap bakteri *S. aureus*,

Data penelitian uji antibakteri yang didapatkan kemudian dianalisis menggunakan uji statistik *One Way Anova* untuk mengetahui adanya pengaruh isolat fraksi terduga tunggal terhadap pertumbuhan bakteri *S. aureus*. Hasil *Saphiro-Wilk* menunjukkan bahwa sebagian besar data memiliki nilai $p > 0,05$ yang artinya bahwa data tersebut terdistribusi normal. Uji normalitas data adalah salah satu syarat dari data parametrik sehingga dapat dilakukan analisis *One Way Anova*. Adapun data uji normalitas *terlampir*. Pada uji *One Way Anova*, apabila data nilai F hitung $>$ F tabel dengan taraf signifikansi 5% maka data tersebut dinyatakan signifikan atau dapat berpengaruh. Data uji *One Way Anova* dapat diamati pada Tabel 4.4.

Tabel 4.4 Uji *One Way Anova*

	Jumlah kuadrat	Df	Kuadrat tengah	F hitung	F tabel
Antar kelompok	1828,810	6	304,802	129,310	,000
Dalam kelompok	33,000	14	2,357		
Total	1861,810	20			

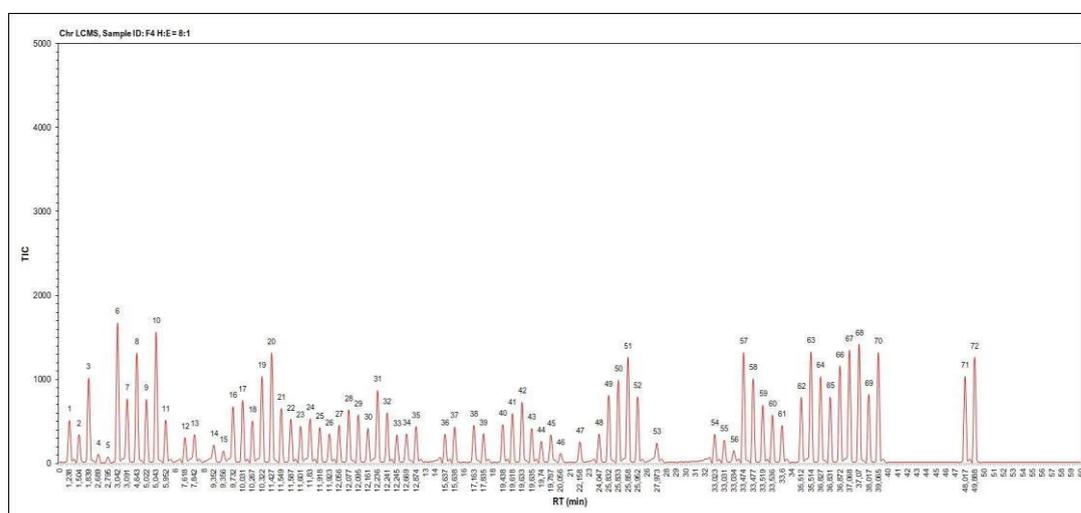
Hasil uji statistik *One Way Anova* menunjukkan data memiliki nilai signifikansi 0,000, hal ini berarti nilai F hitung sampel lebih besar dari nilai F tabel sehingga memiliki arti bahwa sampel yang diujikan berpengaruh atau memiliki interaksi yang signifikan terhadap diameter zona hambat dan dapat diuji lanjut dengan uji Tukey. Uji Tukey dengan taraf signifikansi 5% dilakukan untuk mengetahui perbedaan signifikansi antar sampel terhadap diameter zona hambat yang terbentuk. Adapun data uji Tukey *terlampir*. Pada data hasil uji Tukey menunjukkan bahwa tidak semua sampel memiliki perbedaan yang signifikan terhadap sampel uji yang lain. Hanya sampel isolat fraksi ke-4 yang memiliki perbedaan yang signifikan dengan seluruh sampel yang lain begitupula dengan antibiotik Ciprofloksasin.

Kontrol positif yang digunakan pada penelitian ini adalah antibiotik Ciprofloksasin. Ciprofloksasin adalah antibiotik golongan fluorokuinolon yang menunjukkan hasil sensitif terhadap pertumbuhan bakteri *S. aureus*. Antibiotik fluorokuinolon bekerja dengan menghambat sintesis DNA bakteri melalui

penghambatan DNA girase dan topoisomerase IV (Apridamayanti *et al.*, 2017). Adapun sampel yang diujikan pada penelitian ini adalah isolat fraksi terduga tunggal yang juga mengandung senyawa antibakteri yang dapat diamati dari terbentuknya zona hambat. Hal tersebut sesuai dengan penelitian Singh *et al* (2015) yang menjelaskan bahwa hasil mikrofraksiasi HPLC ekstrak air daun tebu teridentifikasi berbagai flavon -O- dan -C- glikosida yang diketahui mengandung berbagai senyawa flavonoid sebagai senyawa antibakteri. Flavonoid dapat bekerja sebagai antiseptik dan desinfektan dengan cara denaturasi dan koagulasi protein sel bakteri.

4.3 Uji Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder

Analisis LC-MS dilakukan untuk mengidentifikasi senyawa yang terkandung pada isolat fraksi terduga tunggal yang memiliki aktivitas antibakteri tertinggi. Kandungan senyawa tersebut digambarkan dalam bentuk kromatogram dengan berat molekul yang berbeda. Berikut hasil uji LC-MS pada isolat fraksi ke-4 dengan perbandingan eluen n-heksana : etil asetat adalah 9:1. Adapun jenis senyawa yang terkandung dan berat molekul pada isolat fraksi ke-4 daun tebu *terlampir*.



Gambar 4.5 Kromatogram isolat fraksi ke-4 daun tebu

LC-MS adalah suatu teknik dengan resolusi tinggi dalam pemisahan senyawa serta dapat digunakan untuk analisis kuantitatif dan struktural sehingga mampu menentukan profil suatu metabolit yang terkandung dalam suatu senyawa uji (Abdullah & Reyhan, 2017). LC-MS didasarkan pada teknik analisis kimia yang mampu menganalisis bobot molekul sampel dan memiliki kekayaan informasi struktural dari senyawa yang terdeteksi.

Pada gambar 4.5 menunjukkan bahwa hasil analisis menggunakan LC-MS terdapat 72 puncak yang berarti isolat fraksi ke-4 daun tebu belum murni. Hal ini berbeda dengan hasil uji kemurnian menggunakan metode KLT dan spektrofotometri UV-Vis yang dapat dikarenakan oleh beberapa faktor diantaranya ketidaktepatan dalam pembuatan eluen serta banyaknya senyawa pada panjang gelombang dibawah 400 nm yang tidak bias memendarkan sinar UV. Isolat fraksi ke-4 daun tebu mengandung 72 senyawa dengan berat molekul *terlampir*. Terdapat 10 senyawa dengan puncak yang lebih tinggi dari 72 senyawa yang lain yaitu senyawa gallic acid, caffeic acid, ferulic acid, quercetin, isorhamnetin-3-O-glucoside, 2''-O- α -L-rhamnosyl-6-C-fucosyl-luteolin, quercetin-3-Oneohesperidoside, tricin-7-neohesperidoside, tricin-7-rutinoside, tricin-7-rhamnosyl-(1>2)-galacturonide.

Hidayah *et al* (2017) menyatakan bahwa senyawa fenol murni diantaranya adalah gallic acid, cafeic acid yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *S. aureus*, selain itu terdapat senyawa fenol lainnya pada 10 puncak tertinggi isolat fraksi ke-4 yaitu ferulic acid. Mekanisme kerja antibakteri senyawa fenol yaitu dengan mengganggu komponen peptidoglikan pada dinding sel bakteri dengan cara mencegah digabungkannya ikatan asam N-asetilmuramat ke dalam struktur mukopeptida yang biasanya membentuk sifat kaku pada dinding sel sehingga sintesis dinding sel bakteri terganggu dan hanya menyisakan membran sel yang rentan terhadap kerusakan.

Pada 10 puncak tertinggi isolat fraksi ke-4 juga terdapat senyawa flavonoid yaitu quercetin, isorhamnetin-3-O-glucoside, 2''-O- α -L-rhamnosyl-6-C-fucosyl-luteolin, quercetin-3-Oneohesperidoside, tricin-7-neohesperidoside, tricin-7-rutinoside, tricin-7-rhamnosyl-(1>2)-galacturonide. Pada penelitian yang dilakukan Colombo *et al* (2009) menunjukkan bahwa pada air tebu terkandung senyawa flavonoid salah satunya adalah Tricin-7-neohesperidoside. Mekanisme kerja flavonoid sebagai antibakteri adalah membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut sehingga dapat merusak membran sel bakteri serta menghambat metabolisme energi bakteri (Ngajow *et al.*, 2013).

Senyawa yang terkandung dalam isolat fraksi ke-4 daun tebu sebagian besar tersaji pada tabel 4.5 sebagai berikut :

Tabel 4.5 Senyawa pada isolat fraksi₄ daun tebu

1. Flavonoid

Flavon			
No	Nama	Berat molekul (g/mol)	Fungsi
1	Orientin	476,430	Antiinflamasi dan antibakteri terhadap <i>E.coli</i> , <i>S.aureus</i> .
2	Tricin	330,292	Antioksidan dan melindungi tanaman dari serangga.
3	Isoscoparin-2''-O-Glucoside	624,548	Antioksidan, antibakteri, dan antiadipogenik.
4	2''-O- α -L-rhamnosyl-6-C-fucosyl-Luteolin	578,523	Antibakteri dan antioksidan.

Flavanon			
No	Nama	Berat molekul (g/mol)	Fungsi
1	Naringenin	272,257	Antioksidan, antidepresan, anti-inflamasi dengan menghambat rekrutmen leukosit dan mengurangi stress oksidatif
2	Sakuranetin	286,283	Antibakteri dan antijamur.
Flavonol			
No	Nama	Berat molekul (g/mol)	Fungsi
1	Kaempferol	286,239	Membantu meningkatkan pertahanan antioksidan tubuh, menghambat pertumbuhan mikroba.
2	Quercetin	302,042	Antibakteri dengan mendenaturasi protein bakteri.
3	Jaceidin	360,084	Antibakteri dengan menghambat enzim enoyl reductase pada bakteri.

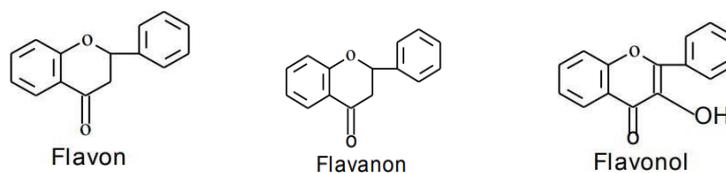
2. Saponin

No	Nama	Berat molekul (g/mol)	Fungsi
1	Isoarborinol	426,729	Menghambat pertumbuhan <i>Entamoeba histolytica</i> .
2	α -amyrin	426,729	Anti-inflamasi, antihypergemic, antibakteri terhadap <i>Escherichia coli</i> dan <i>Proteus vulgaris</i> .
3	Cycloartenol	426,729	Antibakteri, anti-inflamasi.
4	Fernenol	426,729	Antibakteri.
5	Arundoin	440,756	Antimikroba.

3. Steroid

No	Nama	Berat molekul (g/mol)	Fungsi
1	β -sitosterol	414,718	Bioinsektisida, antifungi, antibakteri.

Senyawa flavonoid adalah senyawa polifenol yang mempunyai 15 atom karbon dan tersusun dalam konfigurasi C6-C3-C6, yang berarti kerangka karbonnya terdiri atas dua gugus C6 (cincin benzena tersubstitusi) yang disambungkan oleh rantai alifatik tiga karbon. Senyawa flavonoid ada yang berupa aglikon saja dan ada pula yang berbentuk glikosida. Aglikon flavonoid dibagi dalam beberapa golongan dengan struktur dasar tertentu seperti : flavon, flavonol, isoflavon, katekin, flavanon, leukoantosianin, auron, kalkon dan dihidroflavonol. Adapun isolat fraksi daun tebu hanya mengandung beberapa senyawa aglikon flavonoid seperti flavon, flavanon, dan flavonol. Berikut struktur kimia dari flavon, flavanon dan flavonol.



Gambar 4.6 Struktur kimia senyawa flavon, flavanon, flavonol
Sumber : Arifin & Ibrahim, 2018

Flavon dan flavonol adalah senyawa flavonoid yang banyak ditemukan pada tanaman. Perbedaan antara flavon dan flavonol adalah pada flavon tidak ditemukannya gugus hidroksil pada atom C3. Flavon yang sering dijumpai pada tanaman adalah luteolin. Luteolin adalah senyawa flavonoid semi polar yang diduga tersari dalam fraksi etil asetat dan memiliki berat molekul sebesar 578,523 g/mol. Luteolin memiliki aktivitas antibakteri dengan cara mengurangi sintesis asam nukleat dan protein (Saputri, 2014). Quercetin dan quercetin-3-O-neohesperidoside adalah salah satu flavonol terbaik. Quercetin memiliki struktur cincin dan konfigurasi aglikon dari kelompok hidroksil yang menjadikannya salah satu senyawa flavonoid yang paling ampuh dalam hal kemampuan antioksidan (Arifin & Ibrahim, 2018). Quercetin juga memiliki aktivitas antibakteri karena adanya gugus fenol yang akan mendenaturasi protein dan merusak membran sel mikroba (Sudarwati & Sumarni, 2016). Flavanon adalah senyawa yang tak berwarna dan tidak dapat terdeteksi pada pemeriksaan kromatografi kecuali bila menggunakan penyempotan kromogen. Sakuranetin adalah flavanon dengan

berat molekul sebesar 286,283 g/mol yang berperan sebagai pertahanan tanaman karena memiliki aktivitas antibakteri, antijamur, antiinflamasi dan sitotoksitas pada sel karsinoma (Arifin & Ibrahim, 2018).

Isoarborinol, α -amyrin, cycloartenol, fernenol, arundoin adalah senyawa saponin yang termasuk golongan triterpenoid. Saponin adalah senyawa dalam bentuk glikosida yang tersebar luas pada tumbuhan dan menimbulkan busa apabila dikocok dengan air. Mekanisme triterpenoid sebagai antibakteri adalah bereaksi dengan porin di luar dinding sel bakteri dan membentuk ikatan polimer yang mengakibatkan porin rusak sehingga mengurangi permeabilitas membran sel bakteri dan mengakibatkan bakteri kekurangan nutrisi, pertumbuhan terhambat dan mati (Putri *et al.*, 2020).

β -sitosterol adalah salah satu kelompok senyawa steroid dengan berat molekul sebesar 414,7180 g/mol. β -sitosterol banyak ditemukan pada tanaman dan berwarna putih. Steroid adalah salah satu golongan senyawa metabolit sekunder yang memiliki aktivitas bioinsektisida, antifungi, antibakteri, dan antidiabetes (Hidayah *et al.*, 2016). Mekanisme steroid sebagai antibakteri adalah berinteraksi dengan membrane fosfolipid sel yang bersifat permeabel terhadap senyawa- senyawa lipofilik sehingga menyebabkan integritas membrane menurun serta morfologi membrane sel berubah sehingga menyebabkan sel rapuh dan lisis (Rijayanti, 2014).

Aktivitas antibakteri pada isolat fraksi₄ sebagian besar bekerja dengan mengganggu permeabilitas dari membran sel dan mengganggu komponen peptidoglikan. Hal ini disebabkan oleh senyawa metabolit sekunder yang terkandung pada isolat fraksi₄ yaitu fenol, flavonoid, saponin dan steroid yang menyebabkan kebocoran sel sehingga fungsi organel sel yang lain terganggu. Apabila semua fungsi tersebut terganggu maka sel bakteri akan lisis dan mati. Bakteri *S. aureus* adalah bakteri gram positif yang memiliki lapisan peptidoglikan yang tebal sehingga lebih sensitif terhadap senyawa yang memiliki potensi untuk merusak atau menghambat sintesis dinding sel yang dapat mengakibatkan kematian bakteri *S. aureus*.

Pada penelitian ini belum didapatkan senyawa murni dari isolat fraksi daun tebu, namun sebagian besar senyawa yang terkandung dalam isolat fraksi memiliki aktivitas sebagai antibakteri seperti senyawa flavonoid yaitu luteolin, quercetin, sakuranetin, begitupula dengan senyawa saponin seperti isoarborinol, α -amyrin, cycloartenol, fernenol, arundoin, dan senyawa steroid seperti β -sitosterol. Isolat fraksi daun tebu memiliki aktivitas antibakteri yang lebih baik daripada ekstrak daun tebu hal ini dapat dikarenakan pada ekstrak daun tebu masih terdapat lebih banyak senyawa *multicomound* yang diduga bekerja secara antagonis. Apabila senyawa tersebut bekerja secara antagonis maka khasiatnya akan berkurang atau bahkan tidak ada (Harbone, 1987). Pemurnian senyawa telah berhasil mengurangi jumlah senyawa yang bersifat antagonis, namun demikian isolasi fraksi daun tebu lebih lanjut perlu dilakukan agar dapat diperoleh senyawa murni yang spesifik yang dapat menghambat pertumbuhan *S. aureus* ATCC 25923.

BAB V

PENUTUP

5.1 Simpulan

Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian ini adalah :

1. Hasil analisis kromatografi lapis tipis dan spektrofotometri menunjukkan adanya 5 isolat fraksi terduga tunggal dari daun tebu. Isolat fraksi ini diperoleh pada fraksinasi kromatografi kolom dengan perbandingan aplikasi eluen n-heksana : etil asetat yaitu 90 ml : 10 ml.
2. Isolat fraksi terduga tunggal dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* strain ATCC 25923. Potensi antibakteri terbesar diberikan oleh fraksi ke-4 dengan rata-rata zona hambat sebesar 14,5 mm.
3. Hasil LC-MS terdapat beberapa kandungan senyawa metabolit sekunder pada isolat fraksi ke-4 yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* strain ATCC 25923 adalah senyawa fenol yaitu gallic acid, caffeic acid, ferulic acid, senyawa flavonoid yaitu quercetin, isorhamnetin-3-O-glucoside, 2''-O- α -L-rhamnosyl-6-C-fucosyl-luteolin, quercetin-3-Oneohesperidoside, tricetin-7-neohesperidoside, tricetin-7-rutinoside, tricetin-7-rhamnosyl-(1 \rightarrow 2)-galacturonide, senyawa saponin yaitu Isoarborinol, α -amyrin, cycloartenol, fernenol, arundoin dan senyawa steroid yaitu β -sitosterol.

5.2 Saran

1. Pada penelitian yang lebih *advance*, maka pemurnian kembali isolat fraksi ke-4 daun tebu dengan metode yang tepat sebaiknya dilakukan untuk memperoleh senyawa yang spesifik sebagai zat antibakteri penghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* strain ATCC 25923.
2. Deteksi yang lebih detail akan lebih jelas jika pada penelitian yang terkait dapat dilakukan uji SEM (*Scanning Electron Microscope*) untuk mengetahui kerusakan bakteri agar dapat diketahui kemampuan antibakteri sebagai bakteristatik atau bakterisidal.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, A. N., & Reyhan, M. 2017. Karakterisasi dan Identifikasi Senyawa aktif ekstrak pigmen telur keong mas. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 20(2):286-295.
- Alen, Y., Agresa, F. L., Yuliandra, Y. 2017. Analisis Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Aktivitas Anti hiperurisemia Ekstrak Rebung *Schizostachyum brachycladum* Kurz (Kurz) pada Mencit Putih Jantan. *Jurnal Sains Farmasi & Klinis*, 3(2):146- 152.
- Alfian, F. N., Resanto, D., Soeparjono, S. 2015. Induksi Kalus Embriogenik Tanaman Tebu (*Saccharum Officinarum* L.) Varietas NXI 1-3. *Berkala Ilmiah Pertanian*, 1(1):20.
- Apridamayanti, P., Anggun, M. J., Rafika, S. 2017. Sensitivitas Bakteri *S. aureus* terhadap Antibiotik Terapi Ulkus Diabetikum Derajat III dan IV Wagner. *Seminar Nasional*. Pontianak: Universitas Tanjung pura.
- Arifin, B., & Ibrahim, S. 2018. Struktur, Bioaktivitas dan Antioksidan Flavonoid. *Jurnal Zarah*, 6(1):21-29.
- Colombo, R., Yariwake, J. H., Queiroz, E. F., Ndjoko, K., Hostettmann, K. 2009. On-line identification of minor flavones from sugarcane juice by LC/UV/MS and post-column derivatization. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 20(9), 1574-1579.
- Ditjenbun. 2013. *Direktoral Jendral Perkebunan Tahun 2013*. Jakarta: Direktoral Jendral Perkebunan.
- Harbone, J. B. 1987. *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Bandung: ITB.
- Harris, L. G., Foster, S. J., Richards, R. G. 2002. An Introduction To *S. aureus* and Techniques for Identifying and Quantifying *S. aureus* Adhesions In Relation to Adhesion to Biomaterials: *European Cells and Materials*, 4(10):39-60.
- Haryanti, S. 2008. Respon pertumbuhan jumlah dan luas daun nilam (*Pogostemon cablin* Benth) pada tingkat naungan yang berbeda. *Anatomi Fisiologi*, 16(2), 20-26.
- Hazenbos, W. L., Skippington, E., Tan, M. W. 2017. *S. aureus* Type I Signal Peptidase: Essential Or Not Essential, That's The Question. *Microbial Cell*, 4(4):108.

- Hidayah, N., Mustikaningtyas, D., Bintari, S. H. 2017. Aktivitas Antibakteri Infusa Simplisia *Sargassum muticum* terhadap Pertumbuhan *S. aureus*. *Life Science*, 6(2), 49-54.
- Hidayah, W. W., Kusriani, D., Fachriyah, E. 2016. Isolasi, Identifikasi Senyawa Steroid dari Daun Getih-Getihan (*Rivina humilis* L.) dan Uji Aktivitas sebagai Antibakteri. *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*, 19(1):32-37.
- Indrati, D., & Putra, R. K. 2016. Outlook Tebu Komoditas Pertanian Subsektor Perkebunan. Jakarta: Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian Sekretariat Jenderal–Kemneterian Pertanian.
- Jamilatun, M. 2019. Uji Resistensi Antibiotik *S. aureus* Isolat Kolam Renang. *Biomedika*, 12(1), 1-8.
- Karimela, E. J., Ijong, F. G., Dien, H. A. 2017. Karakteristik *S. aureus* yang diisolasi dari Ikan Asap Pinekuhe Hasil Olahan Tradisional Kabupaten Sangihe. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 20(1):188-198.
- Litbang Induk. 2012. Varietas NXI 1-3. Tersedia Di <https://litbanginduk.blogspot.com/2012/06/diskripsi-varietas-tebu-saccharum.html>. [Diakses 15-11-2019]
- Mamza, S. A., Geidam, Y. A., Mshelia, G. D., Ekwu, G. O., Gulani, I. 2016. Morphological and Biochemical Characterization Of *Staphylococci* Isolated From Food-Producing Animals In Northern Nigeria *International Standard Journal Number*, 1(1):1-8.
- Mastur, M. 2016. Respon fisiologis tanaman tebu terhadap kekeringan. *Buletin Tanaman Tembakau, Serat dan Minyak Industri*, 8(2), 98-111.
- Mil, G., Kasman, K., & Iqbal, I. 2017. Analisa Kualitas Klorofil Daun Jarak Kepyar (*Ricinus comunis* L) Sebagai Bahan Pewarna Pada Dye Sensitized Solar Cell (DSSC). *Gravitasi*, 16(2).
- Moodley, P., & Kana, E. G. 2015. Optimization of xylose and glucose production from sugarcane leaves (*Saccharum officinarum*) using hybrid pretreatment techniques and assessment for hydrogen generation at semi-pilot scale. *International journal of hydrogen energy*, 40(10), 3859-3867.
- Ngajow, M., Abidjulu, J., Kamu, V. S. 2013. Pengaruh antibakteri ekstrak kulit batang matoa (*Pometiappinnata*) terhadap bakteri *S. aureus* secara in vitro. *Jurnal Mipa*, 2(2), 128-132.
- Novaryatiin, S., Pratomo, G. S., Yunari, C. 2018. Uji daya hambat ekstrak etanol daun jerangau hijau terhadap *S. aureus*. *Borneo Journal of Pharmacy*, 1(1), 11-15

- Octaviani, M., Fadhli, H., Yuneistya, E. 2019. Uji Aktivitas Antimikroba Ekstrak Etanol Kulit Bawang Merah (*Allium cepa* L.) dengan Metode Difusi Cakram. *Pharmaceutical Sciences & Research*, 6(1), 8.
- Pathak, D. V., & Tiwari, V. K. 2017. Phytochemical Screening of *Saccharum officinarum* (Linn.) Stem. *International journal of Innovative Science and Research Technology*, 2(8), 291-305.
- Putri, R. A., Ramlan, D., Khomsatun, K. 2020. Pengaruh Pemakaian Perasan Akar Rumpun Alang-alang Sebagai Hand Sanitizer Terhadap Angka Kuman Tangan Cleaning Service. *Buletin Keslingmas*, 39(1):6-12.
- Rahmi, Y., Darmawi, D., Abrar, M., Jamin, F., Fakhurrazi, F., Fahrimal, Y. 2015. Identifikasi Bakteri *S. aureus* Pada Preputium Dan Vagina Kuda (*Equus caballus*). *Jurnal Medika Veterinaria*, 9(2):154-158.
- Ridwanuloh, D., & Syarif, F. 2019. Isolasi Dan Identifikasi Senyawa Flavonoid dari Batang Ciplukan (*Physalis angulata* L.). *Pharma Xplore: Jurnal Sains dan Ilmu Farmasi*, 4(1):288-296.
- Rijayanti, R. P. 2014. Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun mangga bacang (*Mangifera foetida*) terhadap *S. aureus* secara in vitro. *Jurnal Mahasiswa PSPD FK Universitas Tanjungpura*, 1(1).
- Romadanu, R., Hanggita, S., Lestari, S. D. 2014. Pengujian Aktivitas Antioksidan Ekstrak Bunga Lotus (*Nelumbo nucifera*). *Jurnal Fishtech*, 3(1):1-7.
- Saputri, I. E. 2014. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq) dan Fraksi fraksinya terhadap *Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa* serta Profil KLTnya. *Doctoral dissertation: Universitas Muhammadiyah Surakarta*.
- Sari, R., Muhani & Fajriaty, I. 2018. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Gaharu (*Aquilaria microcarpa* Baill.) Terhadap Bakteri *S. aureus* dan *Proteus mirabilis*. *Pharmaceutical Sciences and Research (PSR)*, 4(3):143-154.
- Septiani, S., Dewi, E. N., Wijayanti, I. 2017. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Lamun (*Cymodocea rotundata*) terhadap Bakteri *S. aureus* dan *Escherichia coli*. *Saintek Perikanan: Indonesian Journal of Fisheries Science and Technology*, 13(1), 1-6.
- Shodiq, A. W. 2018. Pengelolaan Tebu (*Saccharum officinarum* L.) di PG Kebon Agung, Malang dengan Aspek Khusus Produktivitas dan Rendemen Tebu pada Beberapa Varietas dan Kategori Tanaman. *Skripsi*. Bogor: Fakultas Pertanian Institut Pertanian Bogor.

- Singh, A., Uma, R. A., Hayat, M. M., Prabh, S. S., Gagan, S., Ravi, K. D. 2015. Phytochemical Profile Of Sugarcane And Its Potential Health Aspects. *Pharmacognosy Reviews*, 9(17):45-55.
- Sitrait, M. 2007. *Penuntun Fitokimia dalam Farmasi*. Bandung: Penerbit ITB.
- Sudarwati, D., & Sumarni, W. 2016. Uji Aktivitas Senyawa Antibakteri pada Ekstrak Daun Kelor dan Bunga Rosella. *Indonesian Journal of Chemical Science*, 5(1).
- Syahmani, S., Leny, L., Iriani, R., Elfa, N. 2017. Penggunaan Kitin sebagai Alternatif Fase Diam Kromatografi Lapis Tipis Dalam Praktikum Kimia Organik. *Vidya Karya*, 32(1).
- Taleb, H., Maddocks, S. E., Morris, R. K., Kanekanian, A. D. 2016. The antibacterial activity of date syrup polyphenols against *S. aureus* and *E. coli*. *Frontiers in microbiology*, 7, 198.
- Tanaya, V., Retnowati, R., Suratmo, S. 2015. Fraksi semi polar dari daun mangga kasturi (*Mangifera casturi* Kosterm). *Jurnal Ilmu Kimia Universitas Brawijaya*, 1(1):778.
- Verheye, W. 2010. Growth and Production Of Sugarcane. *Soils, Plant Growth and Crop Production*, 2:1-23.
- Vila, F. C., Colombo, R., Lira, T. O. D., Yariwake, J. H. 2008. HPLC microfractionation of flavones and antioxidant (radical scavenging) activity of *Saccharum officinarum* L. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 19(5), 903-908.
- Williams, I. O., Onyenweaku, E. O., Atangwho, I. J. 2016. Nutritional and Antimicrobial Evaluation Of *Saccharum officinarum* Consumed In Calabar, Nigeria. *African Journal Of Biotechnology*, 15(33):1789-1795.
- Yuliani, R., Indrayudha, P., Rahmi, S. S. 2011. Aktivitas antibakteri minyak atsiri daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) terhadap *S. aureus*. 4 (2).

Lampiran 1 . Uji Statistik

1. Uji normalitas

	Nama sampel	Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.
Diameter zona hambat	F1	,893	3	,363
	F2	,750	3	,000
	F3	,750	3	,000
	F4	1,000	3	1,000
	F5	1,000	3	1,000
	Ciprofloksasin	,964	3	,637

2. Uji Homogenitas

Levene				
Statistic	df1	df2	Sig.	
6,979	6	14	,001	

3. Deskripsi statistik

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min.	Max.
					Lower Bound	Upper Bound		
F1	3	1,5000	1,32288	,76376	-1,7862	4,7862	,00	2,50
F2	3	1,3333	2,30940	1,33333	-4,4035	7,0702	,00	4,00
F3	3	1,6667	2,88675	1,66667	-5,5044	8,8378	,00	5,00
F4	3	14,5000	,50000	,28868	13,2579	15,7421	14,00	15,00
F5	3	2,5000	,50000	,28868	1,2579	3,7421	2,00	3,00
Ciprofloksasin	3	26,8333	,76376	,44096	24,9360	28,7306	26,00	27,50
Aquades	3	,0000	,00000	,00000	,0000	,0000	,00	,00
Total	21	6,9048	9,64834	2,10544	2,5129	11,2966	,00	27,50

4. Uji One Way Anova

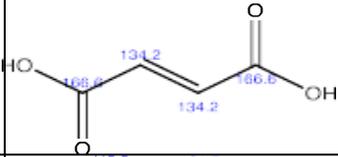
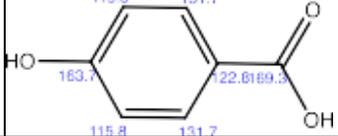
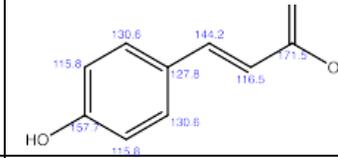
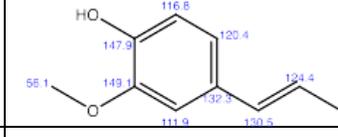
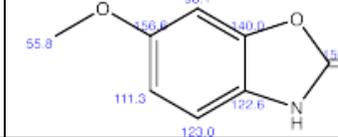
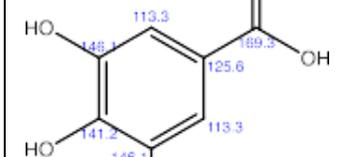
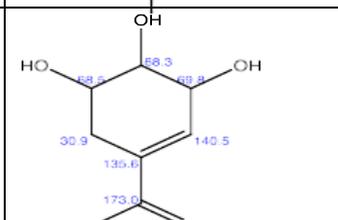
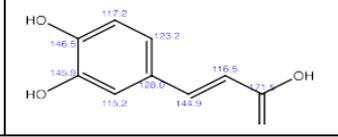
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1828,810	6	304,802	129,310	,000
Within Groups	33,000	14	2,357		
Total	1861,810	20			

5. Uji Tukey

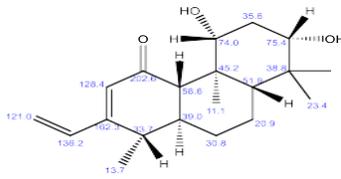
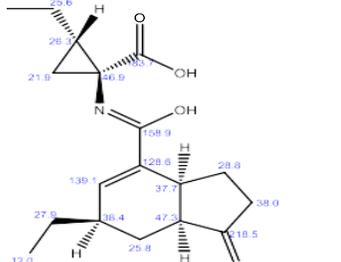
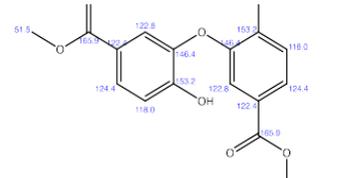
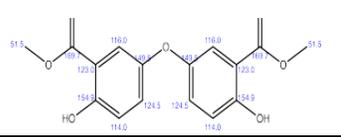
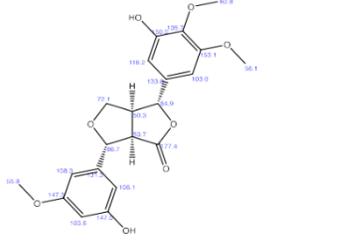
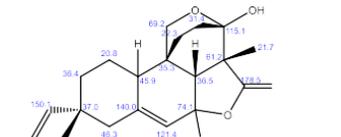
(I) Nama sampel	(J) Nama sampel	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
F1	F2	,16667	1,25357	1,000	-4,1137	4,4471
	F3	-,16667	1,25357	1,000	-4,4471	4,1137
	F4	-13,00000(*)	1,25357	,000	-17,2804	-8,7196
	F5	-1,00000	1,25357	,981	-5,2804	3,2804
	Ciprofloksasin	-25,33333(*)	1,25357	,000	-29,6137	-21,0529
	Aquades	1,50000	1,25357	,884	-2,7804	5,7804
F2	F1	-,16667	1,25357	1,000	-4,4471	4,1137
	F3	-,33333	1,25357	1,000	-4,6137	3,9471
	F4	-13,16667(*)	1,25357	,000	-17,4471	-8,8863
	F5	-1,16667	1,25357	,961	-5,4471	3,1137
	Ciprofloksasin	-25,50000(*)	1,25357	,000	-29,7804	-21,2196
	Aquades	1,33333	1,25357	,929	-2,9471	5,6137
F3	F1	,16667	1,25357	1,000	-4,1137	4,4471
	F2	,33333	1,25357	1,000	-3,9471	4,6137
	F4	-12,83333(*)	1,25357	,000	-17,1137	-8,5529
	F5	-,83333	1,25357	,993	-5,1137	3,4471
	Ciprofloksasin	-25,16667(*)	1,25357	,000	-29,4471	-20,8863
	Aquades	1,66667	1,25357	,828	-2,6137	5,9471
F4	F1	13,00000(*)	1,25357	,000	8,7196	17,2804
	F2	13,16667(*)	1,25357	,000	8,8863	17,4471
	F3	12,83333(*)	1,25357	,000	8,5529	17,1137
	F5	12,00000(*)	1,25357	,000	7,7196	16,2804
	Ciprofloksasin	-12,33333(*)	1,25357	,000	-16,6137	-8,0529
	Aquades	14,50000(*)	1,25357	,000	10,2196	18,7804
F5	F1	1,00000	1,25357	,981	-3,2804	5,2804
	F2	1,16667	1,25357	,961	-3,1137	5,4471
	F3	,83333	1,25357	,993	-3,4471	5,1137
	F4	-12,00000(*)	1,25357	,000	-16,2804	-7,7196
	Ciprofloksasin	-24,33333(*)	1,25357	,000	-28,6137	-20,0529
	Aquades	2,50000	1,25357	,458	-1,7804	6,7804
Ciprofloksasin	F1	25,33333(*)	1,25357	,000	21,0529	29,6137
	F2	25,50000(*)	1,25357	,000	21,2196	29,7804
	F3	25,16667(*)	1,25357	,000	20,8863	29,4471
	F4	12,33333(*)	1,25357	,000	8,0529	16,6137
	F5	24,33333(*)	1,25357	,000	20,0529	28,6137
	Aquades	26,83333(*)	1,25357	,000	22,5529	31,1137
Aquades	F1	-1,50000	1,25357	,884	-5,7804	2,7804
	F2	-1,33333	1,25357	,929	-5,6137	2,9471
	F3	-1,66667	1,25357	,828	-5,9471	2,6137
	F4	-14,50000(*)	1,25357	,000	-18,7804	-10,2196
	F5	-2,50000	1,25357	,458	-6,7804	1,7804
	Ciprofloksasin	-26,83333(*)	1,25357	,000	-31,1137	-22,5529

*: Terdapat perbedaan signifikan

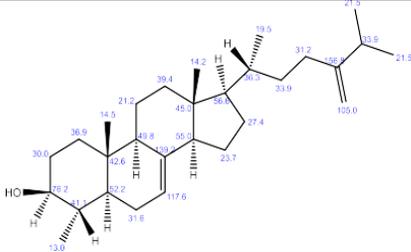
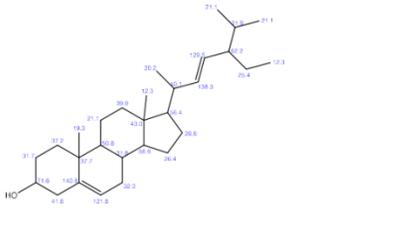
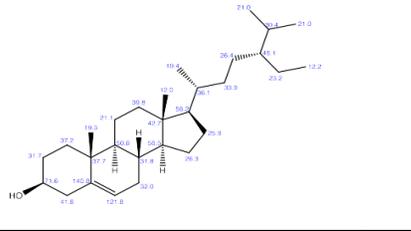
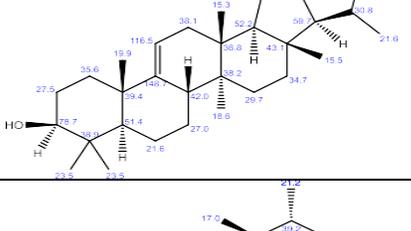
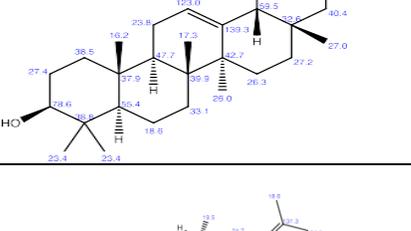
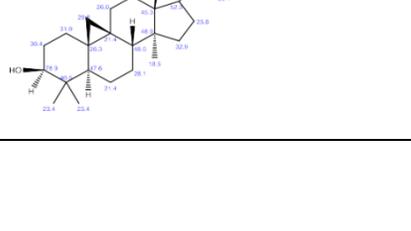
Lampiran 2 . Spektrum Isolat Fraksi ke-4 pada Uji LC-MS

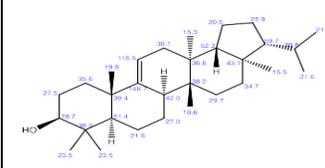
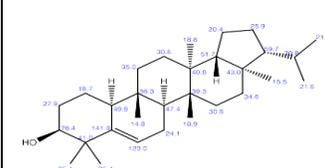
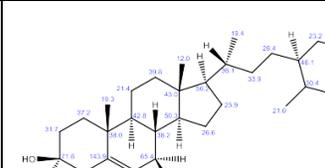
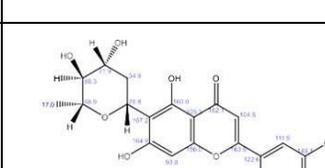
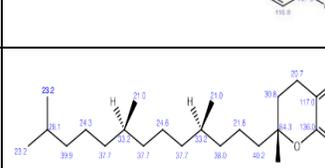
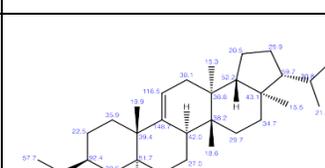
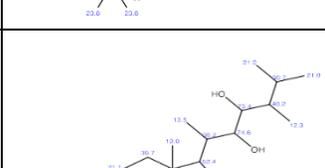
Peak number	Compound name	RT (min)	Molecular weight (g/mol)	NMR 13 C estimation
1	fumaric acid	1,238	116,072	
2	p- hydroxybenzoic acid	1,504	138,112	
3	p-coumaric acid	1,839	164,16	
4	Isoeugenol	2,689	164,204	
5	Coixol	2,795	0,16037	
6	gallic acid	170,120	3,042	
7	shikimic acid	3,091	174,152	
8	caffeic acid	4,643	180,16	

16	naringenin	9,732	272,257	
17	thevetiaflavone	10,031	284,26	
18	sakuranetin	10,267	286,2830	
19	kaempferol	10,322	286,239	
20	quercetin	11,427	302,238	
21	momilactone A	11,549	314,425	
22	phytocassane A	11,587	316,441	

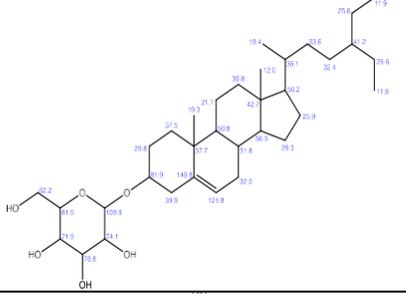
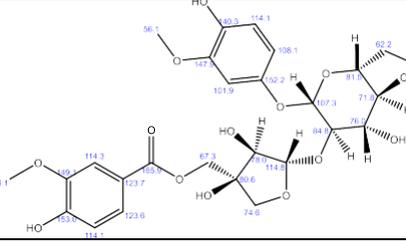
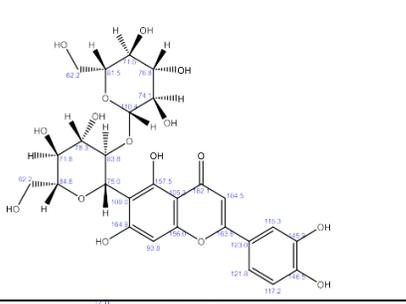
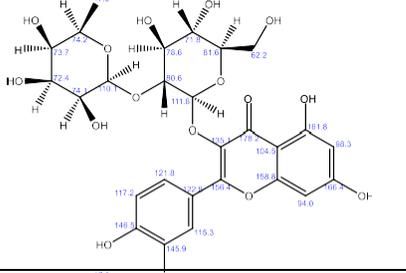
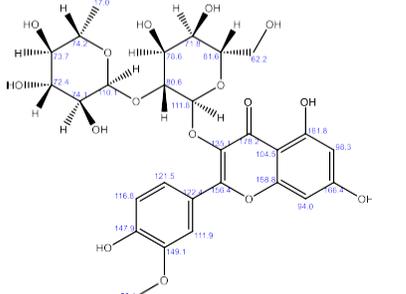
23	phytocassane C	11,601	318,457	
24	coronatine	11,83	319,4	
25	cylindol A	11,918	318,281	
26	cylindol B	11,923	318,281	
27	graminone B	12,056	402,399	
28	momilactone B	12,077	330,424	

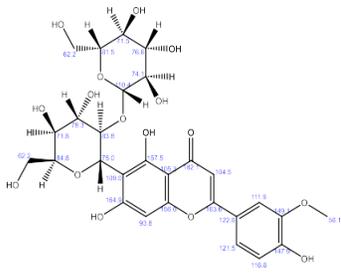
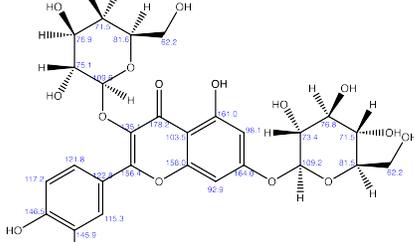
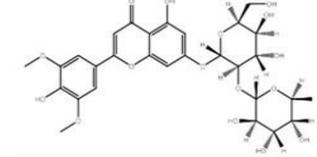
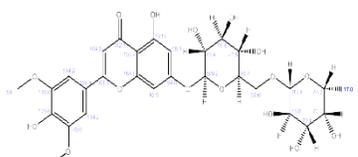
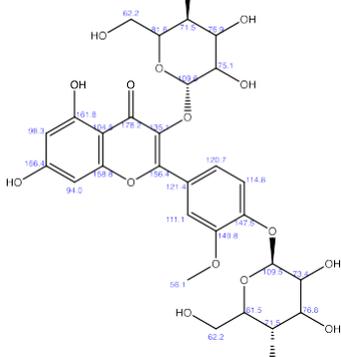
29	phytocassane B	12,095	334,214	
30	cylindrin	12,161	440,7	
31	tricin	12,236	330,29	
32	imperanene	12,241	330,380	
33	deoxycorticosterone	12,245	330,468	
34	jaceidin	12,669	360,318	
35	graminone A	12,874	372,373	

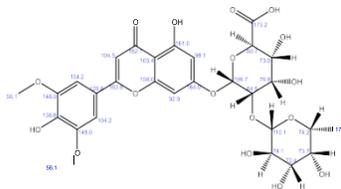
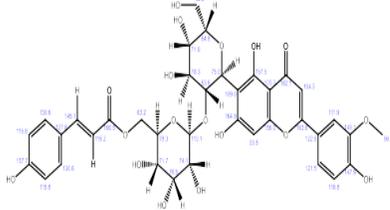
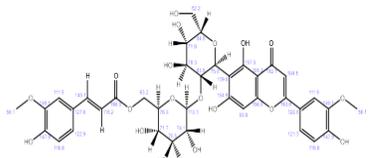
36	24-methylenelophenol	15,637	412,702	
37	stigmasterol	15,638	412,702	
38	β -sitosterol	17,163	414,71	
39	isoarborinol	17,835	426,7	
40	α -amyrin	19,438	426,729	
41	cycloartenol	19,618	426,729	

42	fernenol	19,633	426,729	
43	simiarenol	19,635	426,729	
44	7 α - hydroxysitosterol	19,74	430,717	
45	alternanthin	19,787	430,4	
46	α -tocopherol	20,056	430,71	
47	arundoin	22,158	440,7	
48	castasterone	24,047	464,7	

49	isorientin-7,3'-dimethyl ether	25,832	476,430	
50	orientin-7,3'-dimethylether	25,833	476,434	
51	isorhamnetin-3-O-glucoside	25,858	478,406	
52	tricin 7-O-β-D-glucopyranoside	25,952	492,433	
53	glucotricin	27,973	492,433	
54	neoschaftoside	33,023	564,5	

60	carlinoside	33,536	580,495	
61	seguinoside K	33,6	584,5	
62	isorientin-2''-O-glucopyranoside	33,512	610,5	
63	quercetin-3-O-neohesperidoside	33,514	610,5	
64	isorhamnetin-3-O-neohesperidoside	36,827	624,548	

65	isoscoparin2''-O-glucoside	36,831	624,548	
66	quercetin-3,7-diglucoside	36,872	626,52	
67	tricin-7-neohesperidoside	37,068	638,575	
68	tricetin-7-rutinoside	37,07	638,575	
69	Isorhamnetin-3,4'-diglucoside	38,017	640,547	

70	tricin-7-rhamnosyl(1->2)-galacturonide	39,065	652,558	
71	isoscoparin-2''-(6-(E)-p-coumaroylglucoside)	48,017	770,07	
72	isoscoparin-2''-(6-(E)-ferulylglucoside)	49,888	800,7	

Lampiran 3. Dokumentasi Penelitian

 <p>Menimbang serbuk daun tebu</p>	 <p>Menghomogenkan serbuk daun tebu dengan pelarut etanol</p>	 <p>Proses maserasi daun tebu dengan pelarut etanol</p>
 <p>Fraksinasi ekstrak daun tebu</p>	 <p>Hasil fraksinasi ekstrak daun tebu</p>	 <p>Menguapkan hasil isolat fraksi daun tebu</p>
 <p>Hasil isolat fraksi daun tebu yang dilarutkan dengan H₂O</p>	 <p>Proses uji spektrofotometri isolat fraksi daun tebu</p>	 <p>Pembuatan media MHA</p>



Sterilisasi alat dan bahan



Penuangan media MHA



Rekultur bakteri
S. aureus



Hasil kultur bakteri
S. aureus



Peletakan *blank disk* pada
media MHA



Inkubasi bakteri