

**AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI LARUT ETIL ASETAT DARI
EKSTRAK ETANOL 50% DAUN MURBEI HITAM (*Morus nigra* L.)
TERHADAP *Staphylococcus aureus* DAN PENETAPAN KADAR
FLAVONOID TOTAL**

**ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ETHYL ACETATE FRACTION OF
BLACK MULBERRY (*Morus nigra* L.) LEAF ETHANOL 50%
EXTRACT AGAINST *Staphylococcus aureus* AND DETERMINATION
OF TOTAL FLAVONOID CONTENT**

Zainab¹, Annisa Fitri Munawarroh²

1,2 Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta
Jalan Prof. Dr. Soepomo, Janturan, Warungboto, Yogyakarta 55164

zainab@pharm.uad.ac.id, annisa1929fitri@gmail.com

ABSTRAK

Penyakit infeksi merupakan masalah utama kesehatan di Indonesia. Salah satu jenis bakteri penyebab infeksi yang merugikan manusia adalah *Staphylococcus aureus*. Penggunaan antibiotik yang tidak terkontrol menyebabkan bakteri menjadi resisten. Daun murbei hitam (*Morus nigra* L.) mengandung senyawa flavonoid yang berpotensi sebagai antibakteri. Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui aktivitas antibakteri fraksi etil asetat dari ekstrak etanol 50% daun murbei hitam terhadap *Staphylococcus aureus* dan kadar flavonoid total.

Ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 50% dan fraksinasi menggunakan pelarut kloroform, etil asetat, dan air. Uji aktivitas antibakteri dilakukan menggunakan metode difusi agar cara sumuran. Konsentrasi fraksi etil asetat ekstrak etanol 50% daun murbei hitam yang digunakan sebesar 2,5%, 5%, 10%, 20%, 40% (b/v) dan vankomisin dengan konsentrasi 0,125 mg/ml. Pengukuran zona hambat dilakukan dengan cara mengukur diameter zona jernih yang terbentuk disekitar sumuran. Penetapan kadar flavonoid total dilakukan menggunakan metode *Chang* dengan spektrofotometer UV-Vis. Analisis data kadar flavonoid total dihitung berdasarkan persamaan garis regresi.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa diameter zona hambat fraksi etil asetat ekstrak etanol 50% daun murbei hitam pada konsentrasi 10%, 20%, dan 40% secara berturut-turut sebesar 2,02 mm, 3,70 mm, dan 4,70 mm. Kadar flavonoid total yang terkandung di dalam fraksi etil asetat ekstrak etanol 50% daun murbei hitam sebesar 3,644 mg QE/g sampel.

Kesimpulan pada penelitian ini menunjukkan bahwa konsentrasi 10%, 20%, dan 40% fraksi etil asetat ekstrak etanol 50% daun murbei hitam memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*. Kadar flavonoid total fraksi etil asetat ekstrak etanol 50% daun murbei hitam sebesar 3,644 mg QE/g sampel.

Kata kunci: antibakteri, murbei hitam (*Morus nigra* L.), *Staphylococcus aureus*, kadar flavonoid

ABSTRACT

Infectious diseases are a major health problem in Indonesia. One type of bacterium that causes infections that harms humans is *Staphylococcus aureus*. Uncontrolled use of antibiotics causes bacteria to become resistant. Black mulberry leaves (*Morus nigra* L.) contain flavonoids which contain antibacterial. The purpose of this study was to study the antibacterial activity of ethyl acetate fraction of black mulberry leaves ethanol 50% extract against *Staphylococcus aureus* and total flavonoid content.

Extraction was carried out by maceration using ethanol 50% and fractionation using chloroform, ethyl acetate and water solvents. Antibacterial activity tests were carried out using the diffusion method so that the method is well. The concentration of ethyl acetate fraction of black mulberry leaves ethanol 50% extract used was 2.5%, 5%, 10%, 20%, and 40%. Comparison of vancomycin with a concentration of 0,125 mg/ml. Measuring the inhibition zone is done by measuring the diameter of the clear zone formed based on the well. Determination of total flavonoid content was carried out using the *Chang* method with a UV-Vis spectrophotometer. Data analysis is calculated based on the regression line equation.

The results showed that the inhibitory zone diameter of ethyl acetate fraction of black mulberry leaves ethanol 50% extract at a concentration of 10%, 20%, and 40% combined-contributed 2,02 mm, 3,70 mm and 4,70 mm. The total flavonoid content contained in the ethyl acetate fraction of black mulberry leaves ethanol 50% extract was 3,644 mg QE/g sample.

The conclusion of this study is 10%, 20%, and 40% ethyl acetate fraction of black mulberry leaves ethanol 50% extract have antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*. The total flavonoid content of ethyl acetate fraction of black mulberry leaves ethanol 50% extract was 3,644 mg QE/g sample.

Keywords: *antibacterial, black mulberry (Morus nigra L.), Staphylococcus aureus, flavonoid content*

PENDAHULUAN

Penyakit infeksi masih merupakan masalah utama kesehatan di Indonesia. Salah satu jenis bakteri penyebab infeksi yang merugikan manusia adalah *Staphylococcus aureus*. Bakteri ini merupakan bakteri patogen yang paling banyak menyerang manusia. Apabila jumlahnya sudah banyak dan masuk dalam jaringan tubuh maka akan berbahaya yakni menyebabkan infeksi berkepanjangan bahkan kematian. Radji (2010) menyatakan bahwa bakteri *Staphylococcus aureus* dapat

mengganggu sistem imun yang merupakan pertahanan paling awal tubuh manusia.

Pemberian antibiotik merupakan pengobatan utama dalam penatalaksanaan penyakit infeksi. Penggunaan antibiotik yang tidak terkontrol menyebabkan bakteri menjadi resisten. Hal ini menjadi perhatian serius karena dapat menyebabkan kematian dan membebankan biaya yang besar pada individu dan masyarakat. (Negara, 2014).

Indonesia memiliki ragam jenis tanaman yang dapat dibudidayakan untuk mengobati berbagai penyakit, karena terdapat banyak kandungan kimia yang berperan sebagai obat, salah satunya adalah tanaman murbei hitam (*Morus nigra* L.). Kandungan senyawa aktif yang terdapat pada murbei yaitu alkaloida, flavonoida, dan polifenol (Sunanto, 2009). *Morus nigra* L. memiliki kandungan fenolik dan flavonoid yang paling tinggi diantara murbei yang lainnya (Ercisli & Orhan, 2007). Selain itu, daun murbei hitam mengandung asam klorogenat, isokuersetin, kuersetin, dan rutin. Rutin, isokuersetin, kuersetin adalah senyawa yang termasuk golongan flavonoid. Senyawa golongan flavonoid merupakan salah satu senyawa yang mempunyai aktivitas antibakteri (Alfiyaturohmah, 2013).

Penelitian mengenai aktivitas antibakteri ekstrak etanol 50% daun murbei hitam telah dilakukan oleh Rahmadani (2018). Menurut Rahmadani (2018), ekstrak etanol 50% daun murbei hitam memiliki sifat antibakteri dengan adanya zona hambat terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* sebesar 15,4 mm pada konsentrasi 50 mg/ml.

Penelitian ini dilakukan ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 50% berdasarkan penelitian sebelumnya yang dilakukan

oleh Rahmadani (2018). Kandungan zat aktif yang terkandung didalam daun murbei hitam bersifat polar dan semi polar sehingga dapat disari dengan pelarut yang bersifat semi polar sampai polar (De Freitas *et al.*, 2016). Hal ini yang melatarbelakangi perlunya dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai aktivitas antibakteri daun murbei hitam dengan menggunakan fraksi etil asetat dari ekstrak etanol 50% dan untuk mengetahui seberapa besar kandungan flavonoid total fraksi etil asetat dari ekstrak etanol 50% daun murbei hitam.

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri dan kadar flavonoid total dari fraksi etil asetat ekstrak etanol 50% daun murbei hitam (*Morus nigra* L).

B. Sampel

Sampel yang digunakan adalah daun murbei hitam (*Morus nigra* L.) yang diperoleh pada bulan Oktober 2018 dari Desa Kepek, Kecamatan Pengasih, Kabupaten Kulonprogo, Daerah Istimewa Yogyakarta.

C. Bahan dan Alat yang Digunakan

1. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun murbei hitam,

etanol 50%, kertas saring, larutan NaCl 0,9%, aquades, kloroform p.a, etil asetat teknis, media MHA, BHI, NB, SWFI, standar *Mc Farland*, kapas, aluminium foil, bakteri *Staphylococcus aureus*, kuersetin, AlCl₃ 10%, kalium asetat, methanol p.a.

2. Alat

Alat yang digunakan adalah timbangan analitik, ayakan mesh 40/20, toples kaca, gelas ukur, labu takar, beker glass, pipet ukur, pipet volume, mikropipet, *bluetip*, *yellowtip*, corong kaca, corong buchner, tabung reaksi, rak tabung, batang pengaduk, Erlenmeyer, spreader, ose, cawan porselen, cawan petri, lemari asam, autoklaf, oven, inkubator, LAF, lampu bunsen, penggaris, *rotary evaporator*, *waterbath*, spektrofotometri UV-Vis.

D. Prosedur Penelitian

1. Identifikasi Tanaman

a. Determinasi Tanaman

Tanaman yang diuji diidentifikasi di Laboratorium Biologi Fakultas MIPA Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta. Bagian tanaman yang digunakan adalah daun yang diperoleh dari Desa Kepek, Kecamatan Pengasih, Kulon Progo, Daerah Istimewa Yogyakarta.

b. Pemeriksaan Makroskopis

Pemeriksaan makroskopis dilakukan pada daun segar, daun kering dan serbuk daun murbei hitam. Pemeriksaan ini

dilakukan dengan mengamati bentuk, ukuran, warna, karakteristik permukaan, tekstur, karakteristik pertulangan daun dan potongan tekstur permukaan (Anonim, 2011).

c. Pemeriksaan Mikroskopis

Pemeriksaan mikroskopis dilakukan pada daun segar dan serbuk daun murbei hitam. Penampang melintang dan membujur serta pengamatan serbuk dilakukan dengan menggunakan larutan kloralhidrat (Anonim, 2011).

2. Pembuatan Ekstrak dan Fraksi

Daun murbei hitam yang telah kering diserbuk lalu diayak menggunakan ayakan 40/20. Serbuk daun murbei hitam diekstraksi menggunakan pelarut etanol 50% dengan metode maserasi. Perbandingan jumlah serbuk daun murbei hitam dengan pelarut sebesar 1:9. Pada saat maserasi, dilakukan pengadukan menggunakan *overhead stirrer*. Maserasi didiamkan pada suhu kamar selama 1 hari. Maserat kemudian disaring dengan corong *Buchner* dan dilakukan remaserasi sebanyak 2 kali. Maserat kemudian dikumpulkan dan diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 60°C. Hasil evaporasi kemudian dipanaskan diatas *waterbath* hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental yang diperoleh disimpan di lemari es.

Ekstrak kental daun murbei hitam sebanyak 10 gram dilarutkan dalam 25 ml

air hangat suhu 50°C. Setelah dingin dimasukkan ke dalam corong pisah, ditambahkan 25 ml kloroform dan dikocok secara perlahan-lahan kemudian didiamkan. Fraksi kloroform dipisahkan, kemudian dilakukan pengulangan hingga 3 kali. Fraksi kloroform dikumpulkan dan diuapkan hingga kental. Selanjutnya fraksi air ditambahkan 25 ml etil asetat dan dikocok secara perlahan-lahan kemudian didiamkan. Fraksi etil asetat dipisahkan, kemudian dilakukan pengulangan hingga 3 kali. Fraksi etil asetat dikumpulkan dan diuapkan hingga kental, begitu juga dengan fraksi air diuapkan hingga kental. Fraksi yang diperoleh disimpan di lemari es.

3. Pemeriksaan Karakteristik Ekstrak

a. Organoleptis

Pengujian organoleptis dilakukan dengan pengamatan warna, bau, rasa, bentuk, dan konsistensinya.

b. Penetapan Susut Pengerinan

Ekstrak daun murbei hitam sebanyak 1 gram diletakkan pada lempeng aluminium foil (khusus) kemudian dimasukkan ke dalam alat *Halogen Moisture Analyzer* pada suhu 105°C selama 15 menit.

4. Uji Kualitatif Senyawa Flavonoid

Fraksi etil asetat dari ekstrak etanol 50% daun murbei hitam yang diperoleh dilarutkan dengan etanol. Selanjutnya ditambahkan 2 tetes HCl pekat, dikocok

dan ditambahkan beberapa serbuk Magnesium. Apabila timbul warna merah atau jingga, maka sampel positif mengandung senyawa flavonoid (Riyani, 2015).

5. Uji Aktivitas Antibakteri

Uji antibakteri dilakukan dengan metode difusi agar. Diambil sebanyak 0,1 ml suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* dengan konsentrasi 10⁶ CFU/ml lalu dituangkan diatas media MHA dan diratakan menggunakan spreader. Dibiarkan beberapa menit agar suspensi meresap ke media. Kemudian dibuat sumuran dengan pelubang gabus berdiameter 6 mm. Ke dalam masing-masing sumuran dimasukkan 20µl fraksi etil asetat dengan varian konsentrasi 2,5%, 5%, 10%, 20%, dan 40% (b/v). Kontrol positif yang digunakan adalah antibiotik vankomisin yang dilarutkan dengan SWFI dengan konsentrasi 1 mg/ml, 0,5%, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,0625 mg/ml, dan 0,03125 mg/ml. Masing-masing konsentrasi dimasukkan ke dalam sumuran pada media agar. Kontrol negatif yang digunakan adalah pelarut yang tidak diberi fraksi maupun vankomisin, yaitu SWFI. Media kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C.

Setelah diinkubasi, diamati diameter zona jernih yang terbentuk. Zona jernih menunjukkan adanya aktivitas antibakteri. Diameter zona jernih atau zona hambat

terbesar menunjukkan daya antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* yang paling besar.

6. Penetapan Kadar Flavonoid Total

a. Penentuan Panjang Gelombang

Diambil sebanyak 0,5 ml larutan seri kuersetin yang konsentrasinya 30 µg/ml ditambahkan 1,5 ml etanol 96%, 0,1 ml aluminium klorida 10%, 0,1 ml kalium asetat 1M dan 2,8 ml aquades. Kemudian didiamkan pada suhu kamar selama 30 menit. Baca serapan pada panjang gelombang 400-800 nm dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Chang *et al.*, 2002).

b. Pembuatan Kurva Baku

Dibuat 5 seri larutan pembanding dengan konsentrasi 10, 20, 40, 50, dan 60 µg/ml masing-masing diambil sebanyak 5 ml kemudian ditambahkan 1,5 ml etanol 96%, 0,1 ml aluminium klorida 10%, 0,1 ml kalium asetat 1M dan 2,8 ml aquades. Didiamkan pada suhu kamar selama 30 menit dan dibaca serapannya pada panjang gelombang maksimum yang telah diperoleh (Chang *et al.*, 2002).

c. Penetapan Kadar Flavonoid Sampel

Diambil sebanyak 0,5 ml larutan uji kemudian ditambahkan 1,5 ml etanol 96%, 0,1 ml aluminium klorida 10%, 0,1 ml kalium asetat 1M dan 2,8 ml aquades. Didiamkan pada suhu kamar selama 30 menit dan dibaca serapannya pada panjang gelombang maksimum yang telah

diperoleh (Chang *et al.*, 2002). Kadar flavonoid total dinyatakan dalam mg kuersetin setara dengan gram fraksi (mg QE/g sampel).

E. Analisis Data

1. Penentuan diameter zona hambat fraksi larut etil asetat terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dilakukan dengan cara mengukur menggunakan penggaris pada sisi vertikal dan horizontal kemudian dirata-rata dan dikurangi dengan diameter sumuran.
2. Data yang diperoleh pada penentuan kadar flavonoid total dihitung berdasarkan persamaan garis regresi. Absorbansi sampel dimasukkan ke dalam persamaan:

$$y = Bx + A$$

Selanjutnya dihitung kadar flavonoid total yang dinyatakan dalam mg kuersetin setara dengan gram fraksi (mg QE/g sampel).

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Identifikasi Tanaman

1. Determinasi Tanaman

Hasil determinasi tanaman murbei hitam adalah sebagai berikut :

1b-2b-3b-4b-6b-12b-13b-14b-17b-18b-
19b-20b-21b-22b-23b-24b-25b-26b-27b-
799b-800a Moraceae

1b-2b-4b-6b-8b-9a-11b-12b Morus
(*Morus nigra* L.).

2. Pemeriksaan Makroskopis

Hasil pemeriksaan makroskopik daun murbei hitam adalah jenis daun murbei hitam tunggal, bentuk daun bundar telur (oval), ujung daun berbentuk lancip, pangkal daun berbentuk hati, tepi daun bergerigi, tulang daun menyirip, permukaan daun seperti berbulu. Rata-rata panjang helaian daun 16,31 cm dan lebar helaian daun 9,19 cm. Hasil tersebut sesuai dengan literatur Anonim, 1989.

3. Pemeriksaan Mikroskopis

Pemeriksaan mikroskopis dilakukan untuk mengetahui fragmen-fragmen pengenalan yang ada pada simplisia daun murbei hitam. Hasil yang diperoleh dibandingkan dengan literatur MMI edisi V (1989). Hasil pemeriksaan mikroskopis simplisia daun murbei hitam pada potongan membujur terdapat stomata, sel epidermis, dan sel litosis, pada potongan melintang daun murbei hitam terdapat rambut penutup, rambut kelenjar, berkas pembuluh, dan hablur kalsium oksalat bentuk roset, hablur kalsium oksalat bentuk prisma, dan pada serbuk daun murbei hitam terdapat parenkim.

B. Pemeriksaan Karakteristik Ekstrak

1. Organoleptis

Ekstrak etanol 50% daun murbei hitam berwarna coklat kehijauan ketika diamati di bawah sinar matahari, bau khas daun murbei dan ada sensasi bau aromatis, uji konsistensi atau tekstur memiliki

konsistensi kental beserta tekstur yang lembut dan lengket.

2. Penetapan Susut Pengerinan

Hasil penetapan susut pengerinan ekstrak etanol 50% daun murbei hitam dapat dilihat pada tabel I.

Tabel I. Hasil Penetapan Susut Pengerinan

Bobot sampel (g)	Susut Pengerinan (%)
1,012	8,28
1,025	8,34
1,016	8,29
Rata-rata	8,30
SD	0,032

Berdasarkan tabel II diketahui bahwa rata-rata susut pengerinan yang diperoleh sebesar $8,30 \pm 0,032\%$. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol 50% daun murbei hitam telah memenuhi persyaratan yaitu kurang dari 10% (Anonim, 1995).

C. Uji Kualitatif Senyawa Flavonoid

Tabel II. Hasil Uji Kualitatif Flavonoid

Sampel	Sampel Sebelum ditambah Mg+HCl	Sampel Sesudah ditambah Mg+HCl	Ket.
Kuersetin	kuning	merah	+
Fraksi Etil Asetat	coklat tua	coklat – sedikit merah	+

D. Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri fraksi etil asetat ekstrak etanol 50% daun murbei hitam menggunakan metode difusi dengan

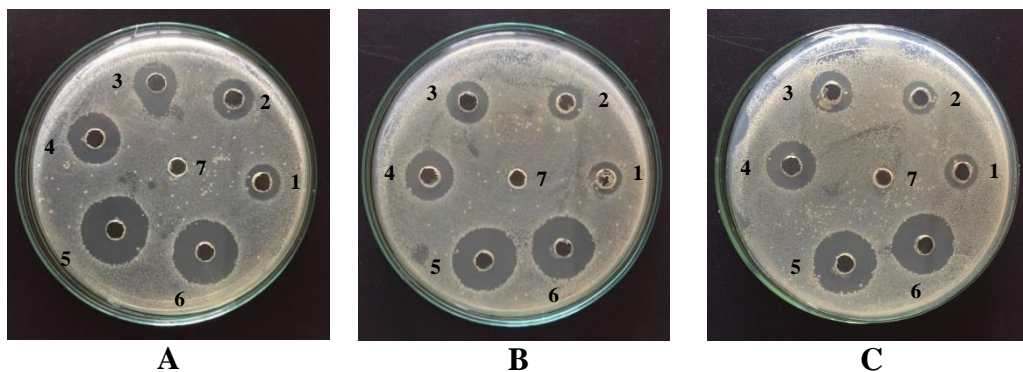
teknik sumuran. Metode difusi sumuran merupakan metode dengan cara melubangi media agar padat yang telah diinokulasi dengan bakteri.

Ketentuan kekuatan daya antibakteri yaitu daerah hambatan 20 mm atau lebih maka termasuk memiliki kekuatan antibakteri sangat kuat, 10-20 mm maka kategori kuat, 5-10 mm kategori sedang, dan 5 mm atau kurang kategori lemah (Davis & Stout, 1971).

Hasil uji aktivitas antibakteri pada vankomisin menunjukkan bahwa vankomisin memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Secara umum vankomisin memiliki mekanisme aksi

dalam menghambat polimerisasi glikopeptida dengan berikatan pada D-Alanyl-DAlanin yang merupakan prekursor dalam pembentukan dinding sel bakteri. Selain itu mekanisme lain dari vankomisin adalah mengubah permeabilitas membran bakteri dan mencegah sintesis RNA (Amman *et al.*, 2011).

Konsentrasi terendah vankomisin yang digunakan, yaitu 0,03125 mg/ml masih bisa menghambat pertumbuhan bakteri dengan zona hambat sebesar 5,25 mm. Hasil uji aktivitas antibakteri vankomisin dapat dilihat pada gambar 1 dan tabel III.



Gambar 1. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Vankomisin (A) Replikasi 1 (B) Replikasi 2 (C) Replikasi 3

Keterangan:

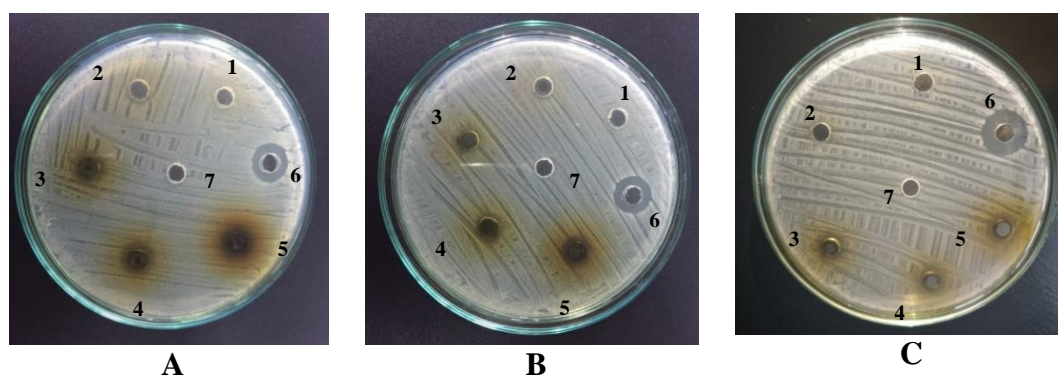
1. Konsentrasi vankomisin 1 mg/ml
2. Konsentrasi vankomisin 0,5 mg/ml
3. Konsentrasi vankomisin 0,25 mg/ml
4. Konsentrasi vankomisin 0,125 mg/ml
5. Konsentrasi vankomisin 0,0625 mg/ml
6. Konsentrasi vankomisin 0,03125 mg/ml
7. Kontrol negatif (SWFI)

Tabel III. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Vankomisin

Konsentrasi (mg/ml)	Diameter Zona Hambat (mm)				Kekuatan daya antibakteri
	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3	Rata-Rata ± SD	
0,03125	5,75	5,00	5,00	5,25 ± 0,43	Sedang
0,0625	7,00	6,25	5,25	6,16 ± 0,87	Sedang
0,125	9,25	7,75	6,50	7,83 ± 1,37	Kuat
0,25	10,25	9,75	9,25	9,75 ± 0,50	Kuat
0,5	15,25	14,25	13,25	14,25 ± 1,00	Kuat
1	15,50	15,00	14,50	15,00 ± 0,50	Kuat
kontrol negative	0	0	0	0	Tidak ada

Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi etil asetat ekstrak etanol 50% daun murbei hitam menunjukkan bahwa fraksi etil asetat memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Hal ini dikarenakan dalam fraksi etil asetat mengandung senyawa-senyawa metabolit golongan flavonoid yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri.

Konsentrasi terkecil fraksi etil asetat ekstrak etanol 50% daun murbei hitam sebesar 10% dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dengan zona hambat sebesar 2,02 mm. Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi etil asetat ekstrak etanol 50% daun murbei hitam dapat dilihat pada gambar 2 dan tabel IV.



Gambar 5. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanol 50% Daun Murbei Hitam (A) Replikasi 1 (B) Replikasi 2 (C) Replikasi 3

Keterangan:

1. Konsentrasi fraksi etil asetat ekstrak etanol 50% daun murbei hitam 2,5%
2. Konsentrasi fraksi etil asetat ekstrak etanol 50% daun murbei hitam 5%
3. Konsentrasi fraksi etil asetat ekstrak etanol 50% daun murbei hitam 10%
4. Konsentrasi fraksi etil asetat ekstrak etanol 50% daun murbei hitam 20%
5. Konsentrasi fraksi etil asetat ekstrak etanol 50% daun murbei hitam 40%
6. Kontrol positif (vankomisin konsentrasi 0,0125%)
7. Kontrol negatif (SWFI)

Tabel IV. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanol 50% Daun Murbei Hitam

Konsentrasi (%)	Diameter Zona Hambat (mm)				Kekuatan daya antibakteri
	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3	Rata-rata ± SD	
2,5	0	0	0	0	Tidak ada
5	0	0	0	0	Tidak ada
10	2,15	1,75	2,15	2,02 ± 0,23	Lemah
20	4,15	3,20	3,75	3,70 ± 0,48	Lemah
40	5,10	4,50	4,50	4,70 ± 0,35	Lemah
vankomisin 0,0125	6,65	6,10	8,10	6,95 ± 1,03	Sedang
kontrol negative	0	0	0	0	Tidak ada

E. Penetapan Kadar Flavonoid Total

Penetapan kadar flavonoid total fraksi etil asetat ekstrak etanol 50% daun murbei hitam menggunakan spektrofotometri UV-Vis dengan metode mengacu pada penelitian yang dilakukan Chang, *et al* (2002). Penetapan kadar flavonoid total ini bertujuan untuk mengetahui berapa besar kadar flavonoid total yang terkandung dalam fraksi etil asetat ekstrak etanol 50% daun murbei hitam karena berkaitan dengan aktivitas antibakterinya. Semakin besar aktivitas antibakteri maka semakin besar pula kadar flavonoid total dalam sampel.

Penetapan kadar flavonoid total ini dilakukan tahap penentuan panjang gelombang maksimum. Penentuan panjang gelombang maksimum menggunakan larutan standar kuersetin dengan konsentrasi 30 µg/ml dan dibaca pada rentang panjang gelombang 400-800 nm. Panjang gelombang maksimum yang

diperoleh pada penelitian ini adalah 433,80 nm.

Tahap selanjutnya adalah pembuatan kurva baku. Pembuatan kurva baku bertujuan untuk mengetahui hubungan antara konsentrasi kuersetin dan absorbansi yang selanjutnya dapat digunakan untuk perhitungan kadar flavonoid total. Seri larutan kurva baku yang digunakan yaitu kuersetin dengan konsentrasi 10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml, 50 µg/ml, dan 60 µg/ml. Hasil pengukuran absorbansi kuersetin dalam berbagai seri konsentrasi dapat dilihat pada tabel V.

Tabel V. Data Absorbansi Kuersetin

Konsentrasi (µg/ml)	Absorbansi
10	0,287
20	0,434
40	0,688
50	0,825
60	1,044

Berdasarkan data absorbansi pada tabel V, dapat dibuat kurva hubungan antara konsentrasi dengan absorbansi

kuersetin. Sehingga diperoleh persamaan regresi linier $y = 0,0145x + 0,1333$ dan $r = 0,9902$ dengan x adalah konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$) dan y adalah absorbansi. Menurut teori, untuk $n=5$ dengan taraf kepercayaan 95% maka harga r tabel sebesar 0,878. Sehingga r hitung lebih besar daripada r tabel maka dapat disimpulkan bahwa persamaan garis linier yang diperoleh menunjukkan adanya hubungan yang signifikan antara konsentrasi larutan perbandingan kuersetin dengan absorbansi. Persamaan ini dapat digunakan untuk menghitung kadar flavonoid total.

Tahap terakhir adalah penetapan kadar flavonoid total fraksi etil asetat ekstrak etanol 50% daun murbei hitam. Prinsip dari metode yang digunakan adalah pembentukan senyawa kompleks khelat dengan C-4 gugus keto, serta C-3

atau C-5 gugus hidroksil dari flavon dan flavonol. Larutan uji ditambahkan AlCl_3 akan terjadi reaksi pembentukan kompleks yang ditandai dengan larutan menghasilkan warna kuning sehingga terjadi pergeseran panjang gelombang ke arah *visible* (tampak) dan penambahan kalium asetat bertujuan untuk mempertahankan panjang gelombang pada daerah *visible* (Chang *et al.*, 2002).

Hasil absorbansi yang diperoleh kemudian disubstitusikan kedalam persamaan $y = 0,0145x + 0,1333$ sehingga diperoleh nilai x (mg/ml) selanjutnya dihitung kadar flavonoid total yang dinyatakan sebagai mg kuersetin setara dengan gram fraksi (mg QE/g sampel). Hasil penetapan kadar flavonoid total fraksi etil asetat ekstrak etanol 50% daun murbei hitam dapat dilihat pada tabel VI.

Tabel VI. Kadar Flavonoid Total Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanol 50% Daun Murbei Hitam

Sampel	Bobot (g)	Volume (ml)	Absorbansi	Kadar (mg QE/g sampel)
1	0,1011	10	0,674	3,688
2	0,1005	10	0,661	3,621
3	0,1001	10	0,662	3,642
4	0,102	10	0,663	3,583
5	0,1013	10	0,675	3,688
Rata-rata				3,644
SD				0,045
CV				1,235

Berdasarkan tabel VI, diperoleh rata-rata kadar flavonoid total fraksi etil asetat ekstrak etanol 50% daun murbei hitam sebesar $3,644 \pm 0,045$ mg QE/g sampel.

CV dari data tersebut sebesar 1,235% yang artinya kurang dari 5%, hal ini menunjukkan bahwa homogenitas data memenuhi syarat. Hasil kadar flavonoid

total fraksi etil asetat dari ekstrak etanol 50% daun murbei hitam berbanding lurus dengan hasil aktivitas antibakteri. Dimana kadar flavonoid total yang diperoleh kecil dan tingkat kekuatan aktivitas antibakterinya juga lemah karena diameter zona hambat bakteri yang terbentuk sangat kecil.

Kadar flavonoid total fraksi etil asetat ekstrak etanol 50% daun murbei hitam ini lebih kecil jika dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan oleh Souza, *et al* (2016) yaitu kadar flavonoid total ekstrak etanol daun murbei hitam yang diperoleh sebesar 35,48 mg CE/g. Kadar yang diperoleh pada penelitian ini sangat kecil karena pelarut etil asetat pada fraksinasi bersifat semi polar sehingga hanya senyawa flavonoid dalam bentuk aglikon yang bersifat semi polar pula yang dapat larut dalam fraksi etil asetat. Sedangkan perbedaan kadar dengan penelitian yang dilakukan Souza, *et al* (2016) disebabkan karena penggunaan pelarut yang berbeda pada proses ekstraksi maupun fraksinasi dan penggunaan standar pembandingan yang berbeda.

KESIMPULAN

1. Fraksi etil asetat ekstrak etanol 50% daun murbei hitam memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*.

2. Diameter zona hambat fraksi etil asetat ekstrak etanol 50% daun murbei hitam terhadap *Staphylococcus aureus* pada konsentrasi 10%, 20%, dan 40% secara berturut-turut adalah 2,02 mm, 3,70 mm, dan 4,70 mm.
3. Kadar flavonoid total yang terkandung di dalam fraksi etil asetat ekstrak etanol 50% daun murbei hitam adalah 3,644 mg QE/g sampel.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih kepada Zainab, M.Si., Apt selaku dosen pembimbing, Dr., Nanik Sulistyani, M.Si., Apt selaku dosen penguji 1, dan Dr., Hari Susanti, M.Si., Apt selaku penguji 2. Terimakasih saya ucapkan kepada Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta.

DAFTAR PUSTAKA

- Amman, V., Basrin, D.F., and Huyop, F., 2011, Determination of the post-antibiotic effect (PAE) of combinations of extracts from galls of *Quercusinfectoria* with vancomycin against *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA), *African Journal of Biotechnology*, 10 (79),18274-18278.
- Anonim, 1995, *Farmakope Indonesia*, Edisi IV, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- Anonim, 2011, Quality Control Methods for Herbal Materials, *World Health Organization*, Geneva, Switzerland, pp 187.

- Chang, Chia-Chi., Ming-Hua, Y., Hwei-Mei, W., and Jing-Chuan, C., 2002, Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods, *Journal of Food and Drug Analysis*, Vol. 10, No. 3, 2002, Pages 178-182.
- De Freitas, M.M., Pedro, R.F., Paula, M.S., Christopher, W.F., Eliete, N.S.G., Yanna, K.M.N., Damaris, S., Yris, F., Luiz, A.S., Mauricio, H., Perola, O.M., 2016, Extracts of *Morus nigra* L. Leaves Standardized in Chlorogenic Acid, Rutin and Isoquercitrin: Tyrosinase Inhibition and Cytotoxicity. *PLoS ONE*, 11(9): e0163130.doi:10.1371/journal.pone.0163130.
- Ercisli, S., and Orhan, E., 2007, Chemical Composition of White (*Morus alba*), Red (*Morus rubra*) and Black (*Morus nigra*) Mulberry Fruits, *Food Chemistry*, 103(4), 1380–1384.
- Negara, K.S., 2014, Analisis Implementasi Kebijakan Penggunaan Antibiotika Rasional untuk Mencegah Resistensi Antibiotika di RSUP Sanglah Denpasar: Studi Kasus Infeksi Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*, *Jurnal ARSI*, Bali.
- Radji, Maksum., 2010, *Buku Ajar, Mikrobiologi (Panduan Mahasiswa Farmasi & Kedokteran)*, Penerbit Buku Kedokteran, Jakarta.
- Rahmadani, Firda., 2018, Aktivitas Antibakteri dan KLT Bioautografi Ekstrak Etanol 50% Daun Murbei Hitam (*Morus nigra* L.) Terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Skripsi*, Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta.
- Riyani, A., dan A, Radwah., 2015, Ekstraksi Flavonoid Metode Soxhletasi dari Batang Pohon Pisang Ambon (*Musa paradisiaca* var. *sapientum*) dengan Berbagai Jenis Pelarut, *Prosiding Simposium Nasional Inovasi dan Pembelajaran Sains*, 8-9 (6): 625-628.
- Souza, G.R., R.G, Oliveira-Junior., T.C, Diniz., A. Branco., S.R.G, Lima-Saraiva., A.L, Guimarães., A.P, Oliveira., A.G.M, Pacheco., M.G, Silva., M.O, Moraes-Filho., M.P, Costa., C.Ó, Pessoa and J.R.G.S, Almeida., 2016, Assessment of the antibacterial, cytotoxic and antioxidant activities of *Morus nigra* L. (Moraceae), *Brazilian Journal of Biology*, ISSN 1678-4375 (Online).
- Sunanto, H., 2009, *100 Resep Sembuhkan Hipertensi, Obesitas dan Asam Urat*, PT. Gramedia, Jakarta.