

JURNAL METAMORFOSA

Journal of Biological Sciences

ISSN: 2302-5697

<http://ojs.unud.ac.id/index.php/metamorfosa>

Uji Potensi Ekstrak Daun Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922

Testing the Potential of Pasak Bumi Leaves (*Eurycoma longifolia* Jack) Extract Against The Growth of *Escherichia coli* ATCC 25922

Sari Dewi Handayani^{1*}, Akhmad²

^{1,2}Program Studi Pendidikan Biologi, Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Mulawarman, Jl. G. Tabur Gn. Kelua, Kec. Samarinda Ulu, Kota Samarinda, Kalimantan Timur
Email: dsarih2001@gmail.com

INTISARI

Dewasa ini, tanaman lokal dari suatu daerah banyak dimanfaatkan sebagai obat tradisional oleh masyarakat karena dipercaya efek samping yang diakibatkan lebih kecil. Hasil kajian farmakologis sebelumnya telah ditemukan bahwa Pasak bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) berpotensi sebagai antikanker, antimalaria, antileukemia, antiinflamasi dan antibakteri. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan menguji ekstrak daun pasak bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) sebagai antibakteri terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922, dengan variasi konsentrasi yakni 15%, 35% dan 55% serta *chloramphenicol* (kontrol positif) dan pelarut etanol 96% (kontrol negatif) sebagai pembanding. Penelitian ini menggunakan metode difusi cakram dengan data kuantitatif dilanjutkan uji KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) dengan metode mikrodilusi cair menggunakan *microplate* 96-well sebagai data kualitatif. Data kuantitatif dianalisis menggunakan *Kruskal Wallis* dan *Mann-Whitney* sebagai uji lanjut. Rata-rata diameter zona hambat oleh ketiga ekstrak daun pasak bumi kategori kuat secara berturut-turut yaitu 12,67mm, 17,07mm, dan 18,67mm. Berdasarkan hasil visual kultur jernih pada uji KHM, kolom sumur ke-4 dengan konsentrasi sebesar 6,875 µg/mL ditentukan sebagai konsentrasi hambat minimum.

Kata kunci: antibakteri, *Eurycoma longifolia* Jack, metode difusi cakram, mikrodilusi cair, 96-well *microplate*

ABSTRACT

Nowadays, local plants from a region are widely used as traditional medicine by the community because they believe the side effects will also be smaller. Previous pharmacological studies have found that *Eurycoma longifolia* Jack has potential as an anti-cancer, antimalaria, anti-leukemia, anti-inflammatory and antibacterial. Therefore, this study aims to test the extract of *Eurycoma longifolia* Jack leaves as an antibiotic against *Escherichia coli* ATCC 25922, with concentration variations of 15%, 35% and 55% as well as *chloramphenicol* (positive control) and ethanol solvent 96% (negative control) as comparisons. The study used disc diffusion method with quantitative data continued the MIC (Minimum Inhibitory Concentration) test with liquid microdilution method using 96-well microplate as qualitative data. The average diameter of the barrier zone by the *Eurycoma longifolia* Jack leaves of the strong categories consecutive are 12.67mm, 17.07mm, and 18.67mm. Based on the clear culture visual

results of the MIC test, the fourth well column with a concentration of 6,875 µg/mL was determined as the minimum barrier concentration.

Keyword: antibacterial, *Eurycoma longifolia* Jack, disc diffusion method, liquid microdilusion, 96-well microplate

PENDAHULUAN

Kasus keracunan pangan selalu dikaitkan dengan mengonsumsi makanan atau air yang tercemar oleh mikroorganisme patogen dan zat beracun di dunia internasional (Rahayu *et al.*, 2018). Infeksi dan intoksikasi merupakan dua kategori penyakit yang terjadi akibat makanan yang tidak higienis. Ketika mengonsumsi makanan yang mengandung organisme, terjadilah infeksi pada tubuh kemudian menimbulkan gejala penyakit. Sedangkan, mengonsumsi makanan yang mengandung zat beracun mengakibatkan keracunan disebut sebagai intoksikasi (Hutasoit, 2020).

Adanya kontaminasi mikroba ketika mengonsumsi makanan yang tidak sehat, menimbulkan gangguan terhadap saluran pencernaan dengan gejala sakit perut sehingga menyebabkan diare. Biasanya mikroba yang berasosiasi yaitu *Escherichia coli* dari famili Enterobacteriaceae. Diare adalah suatu kondisi seseorang memiliki frekuensi buang air besar lebih dari 3 kali sehari dengan konsistensi feses akan lunak dan cair (Ariani, 2016). Infeksi *Escherichia coli* menimbulkan komplikasi sindrom uremik hemolitik yang biasanya diderita oleh balita dan orang tua (Radji, 2009).

Penyakit diare di Indonesia masih memuncaki angka kesakitan dan kematian yang tinggi, hal ini dikarenakan lingkungan yang tidak sehat (Qisti *et al.*, 2021). Berdasarkan hasil data profil kesehatan Indonesia tahun 2018 menunjukkan jumlah kasus diare semua kelompok umur sebesar 8%, balita sejumlah 12,3% dan pada bayi sejumlah 10,6% dari jumlah penduduk di Indonesia. Berdasarkan data tersebut, penyakit diare lebih banyak diderita oleh bayi dan balita dan menjadi salah satu penyebab utama kematian (Kemenkes RI, 2021).

Sehubungan dengan kasus diare yang menjadi permasalahan Indonesia, pengobatan penyakit diare biasanya pemberian oralit guna rehidrasi tubuh, pemberian zinc, asupan ASI untuk balita, dan probiotik (Ariani, 2016). Selain pengobatan tersebut, terdapat alternatif lain yang dapat digunakan oleh masyarakat Indonesia khususnya di Kalimantan Timur. Dewasa ini, tanaman lokal dari suatu daerah banyak dimanfaatkan sebagai obat tradisional oleh masyarakat karena dipercaya efek samping yang diakibatkan juga akan lebih kecil. Salah satu tanaman lokal di Kalimantan Timur ialah Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) dari famili Simaroubaceae, diketahui tumbuh di hutan primer dan sekunder di Pulau Sumatera dan Pulau Kalimantan (Silalahi, 2015).

Saat ini masyarakat memanfaatkan Pasak bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) dalam berbagai pengobatan beberapa penyakit seperti akar untuk pengobatan malaria, kulit dan batang untuk pengobatan demam dan sariawan. Hasil kajian farmakologis sebelumnya telah menemukan bahwa Pasak bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) berpotensi sebagai antikanker, antimalaria, antileukemia, antiinflamasi dan antibakteri (Supartini & Cahyono, 2020).

Berlandaskan adanya masalah kasus diare yang disebabkan oleh bakteri *Escherichia coli* di Kalimantan Timur dan tanaman endemik Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) memiliki kemampuan sebagai antibakteri, penelitian yang akan dilakukan adalah pengujian ekstrak daun pasak bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) sebagai antibakteri *Escherichia coli*. Antibakteri merupakan senyawa yang menghambat perkembangbiakan bakteri dan menghilangkan mikroorganisme patogen.

Pengujian ekstrak daun pasak bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) diharapkan dapat menekan pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*, sehingga dapat digunakan sebagai obat tradisional alternatif pada penyakit diare.

BAHAN DAN METODE

Alat dan Bahan

Penelitian ini memerlukan alat dan bahan. Alat yang digunakan yaitu Pisau, Gelas kimia, Cawan petri, Neraca digital, Batang pengaduk, Wadah ekstrak, Corong kaca, Lampu spiritus, Labu erlenmeyer, Tabung reaksi, Autoklaf, Pipet tetes, Mistar berskala, Rotary evaporator, Inkubator, Hotplate, Masker, Latex, Pipet ukur 10 ml, Mikropipet, *Microplate 96-well*, *Microtube*, Kamera, Spidol, Kertas Label, dan Blender.

Bahan yang digunakan yaitu Daun Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia Jack*) didapatkan dari Arboretum Balai Besar Pengujian, Instrumen dan Standarisasi Kota Samairinda, *Mueller Hinton Agar* (MHA), *Mueller Hinton Broth* (MHB), *Aquades*, NaCl 0,9%, Etanol 96%, NaOH 10%, FeCl₃, HCl 2 N, Kloramfenikol, Kertas saring, Kertas cakram, *Cotton swab* dan *Escherichia coli* ATCC 25922 didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Mulawarman.

Prosedur Penelitian

Ekstraksi Sampel

Daun pasak bumi hijau segar dipetik dan dibersihkan pada air mengalir untuk menyingkirkan kotoran yang menempel pada permukaan daun. Kemudian daun diletakkan dan disebar pada wadah dengan permukaan yang luas mencegah terjadi penumpukan dan memastikan diberikan pengeringan yang tepat.

Proses ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi. Daun pasak bumi (*Eurycoma longifolia Jack*) yang kering dihaluskan dengan blender lalu direndam dalam pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1 : 15 (etanol) selama 2x24 jam dengan lama waktu pengadukan 5 menit setiap 24 jam. Menurut (Kurniawati, 2018) hasil studi menunjukkan perendaman maserasi dapat dilakukan hanya selama 48 jam dengan pelarut etanol 96%. Hal ini merujuk pada faktor jenis pelarut, kepekatan pelarut dan lama perendaman mempengaruhi hasil maserasi. Setelah dimaserasi, ekstrak daun disaring guna memisahkan hasil filtrat dan residu yang kemudian di evaporasi selama 3 jam dan dimasukkan ke dalam oven dengan suhu $\pm 45^{\circ}\text{C}$ sampai didapatkan ekstrak kental. Selanjutnya, uji fitokimia dilaksanakan untuk mengetahui kandungan senyawa aktif yang ada dalam daun.

Skrining Fitokimia

Senyawa fitokimia di uji pada penelitian ini yaitu alkaloid, flavonoid, fenolik, saponin, triterpenoid, dan steroid.

Uji Flavonoid: 1 mL ekstrak sampel direaksikan natrium hidroksida (NaOH) 10% sebanyak 2 tetes dan dikocok kuat dalam tabung reaksi. Sampel positif akan menunjukkan perubahan warna kuning, merah atau jingga (Dewi, 2021).

Uji Alkaloid: 1 ml ekstrak sampel dan reagen Dragendroff dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian dan dikocok kuat. Sampel positif menunjukkan terbentuknya oranye jingga (Dewi, 2021).

Uji Fenolik: 1 ml ekstrak sampel dan pereaksi FeCl₃ dimasukkan ke dalam tabung reaksi, Teridentifikasi senyawa fenolik, jika terjadi perubahan warna hijau atau biru (Manongko, 2020).

Uji Saponin: 1 ml ekstrak sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 5 ml aquades panas dan 2 tetes HCl 2 N kemudian kocok kuat. Hasil positif jika terdapat buih dengan intensitas yang banyak dan konsisten selama 10 menit (Manongko, 2020).

Uji Triterpenoid dan Steroid: 1 ml ekstrak sampel diteteskan ke plat tetes, selanjutnya dilarutkan 1 tetes kloroform lalu ditambahkan dengan 1 tetes asam asetat anhidrat. Larutan yang telah digunakan pada uji triterpenoid, dilanjutkan dengan menambahkan asam sulfat untuk melihat hasil steroid. Hasil positif triterpenoid apabila terdapat perubahan warna menjadi ungu atau jingga, dan positif steroid jika terbentuk warna biru atau hijau (Alviani, 2022).

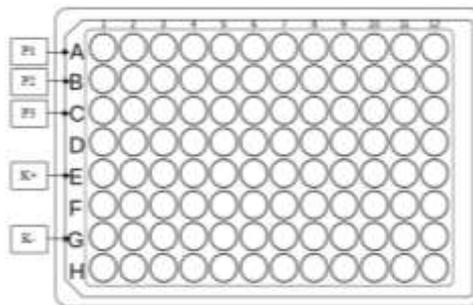
Uji Antibakteri

Cotton swab steril dicelupkan ke dalam suspensi bakteri standar Mc Farland 0,5, setelah meresap pada kapas lalu ditekan sambil diputar-putar pada dinding tabung bagian. Kemudian *cotton swab*

digoreskan-goreskan ke permukaan media MHA steril dengan merata. Kertas cakram diambil sebanyak 4 buah lalu direkatkan pada media agar. Selanjutnya konsentrasi ekstrak 15%, 35% dan 55% daun pasak bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) serta kontrol negatif (etanol 96%) diteteskan pada permukaan cakram menggunakan mikropipet sebanyak 20 μ l. Lalu, cakram *Chloramphenicol* sebagai kontrol positif direkatkan pada media. Media diinkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam. Kemudian, diukur diameter zona hambat menggunakan penggaris sesuai dengan teknik pengukuran pada gambar 2.

Uji KHM (Konsentrasi Hambat Minimum)

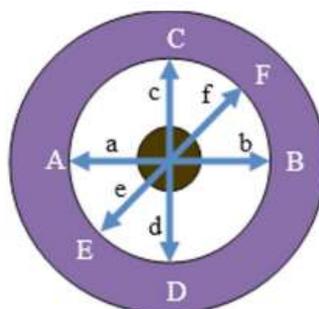
Suspensi bakteri yang telah ditanamkan pada MHB (*Mueller Hinton Broth*) dimasukkan ke dalam kolom baris A, B, C, E dan G menggunakan mikropipet sebanyak 100 μ L. Ekstrak daun pasak bumi 55% (*Eurycoma longifolia* Jack) sebanyak 100 μ L dimasukkan ke dalam kolom 1 baris A lalu dihomogenkan, sehingga pada kolom 1 terdapat 100 μ L MHB dan 100 μ L ekstrak. Dari campuran tersebut sebanyak 100 μ L larutan diambil lalu dipindahkan ke dalam kolom 2. Langkah pengenceran dilakukan berurutan hingga ke kolom 12, lalu diambil 100 μ L pada kolom tersebut dan dibuang. Diulangi kegiatan pengenceran tersebut pada baris B dan C berturut-turut sebagai ulangan 2 dan 3. Kloramfenikol cair dimasukkan ke dalam baris E kolom 1 sebanyak 100 μ L, pengenceran larutan sama dilakukan seperti langkah sebelumnya. Larutan etanol dimasukkan ke dalam baris G kolom 1 sebanyak 100 μ L, pengenceran larutan sama dilakukan seperti langkah sebelumnya. *Microplate 96-well* diinkubasi selama 24 jam. Setelah diinkubasi, diberi reagen MTT (*Metylthiazol Tetrazolium*) lalu diamati status pertumbuhan bakteri dengan melihat kejernihan pada tiap sumur.



Gambar 1. Skema Uji KHM pada *Microplate 96-well*
Sumber: wikipedia.org

Teknik Pengumpulan Data

Teknik pengumpulan data uji antibakteri metode difusi cakram menggunakan metode pengukuran diameter horizontal, vertikal dan diagonal yang diterangkan dalam satuan milimeter (mm). Teknik pengukuran dijelaskan pada gambar 2 sebagai berikut.



Gambar 2. Diagram Pengukuran Zona Bening
Sumber: Mozarta, 2019.

Keterangan:

Data Ukur 1 (mm) = (jarak titik A-B) – (jarak titik a-b)

Data Ukur 2 (mm) = (jarak titik C-D) – (jarak titik c-d)

Data Ukur 3 (mm) = (jarak titik E-F) – (jarak titik e-f)

Perhitungan hasil rata-rata zona bening (mm) dilakukan dengan rumus:

$$\frac{\text{Data 1} + \text{2} + \text{3}}{3}$$

Hasil pengukuran yang didapatkan kemudian dikelompokkan menurut intensitas kekuatan hambat ekstrak daun pasak bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* yang dijabarkan pada tabel 1.

Tabel 1. Kelompok Daya Hambat Pertumbuhan Bakteri

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

Sumber: Winastri, 2020.

Pada uji KHM menggunakan metode pengamatan akurat terhadap visual kultur jernih pada sumur setelah diberi reagen MTT (*Metylthiazol Tetrazolium*). Sumur terakhir yang terlihat menampilkan kultur jernih, ditetapkan sebagai konsentrasi hambat minimum ekstrak daun pasak bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) terhadap pertumbuhan *Escherichia coli* ATCC 25922.

Analisis Data

Rata-rata kekuatan daya hambat ekstrak daun pasak bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 pada konsentrasi ekstrak 15%, 35% dan 55%, di uji menggunakan Non Parametrik yaitu *Kruskall wallis*. Lalu, *Mann-Whitney* sebagai uji lanjut untuk mengetahui perbedaan dari dua sampel yang independen.

HASIL

Skrining Fitokimia

Senyawa fitokimia yang di uji pada penelitian ini yaitu alkaloid, flavonoid, fenolik, saponin, triterpenoid, dan steroid. Hasil uji fitokimia kualitatif daun pasak bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) dengan pelarut etanol 96% disajikan pada Tabel 2 menunjukkan bahwa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak terdapat 3 dari 6 komponen yang diuji yaitu flavonoid, fenolik, dan steroid.

Tabel 2. Hasil Uji Fitokimia Daun Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia* Jack)

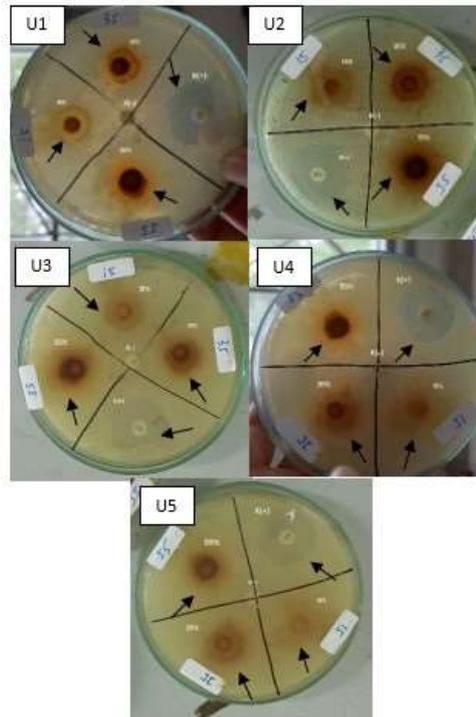
Jenis Senyawa	Pereaksi	Hasil
Alkaloid	Dragendorff	-
Flavonoid	Serbuk Mg + HCl	+
Fenolik	FeCl ₃	+++
Saponin	Aquadest Panas	-
Triterpenoid	Asam Asetat	-
Steroid	Anhidrat	+++
	Asam Asetat Anhidrat + H ₂ SO ₄	

Keterangan: +++ (kuat); ++ (sedang); + (lemah); - (tidak ada)

Uji Aktivitas Antibakteri

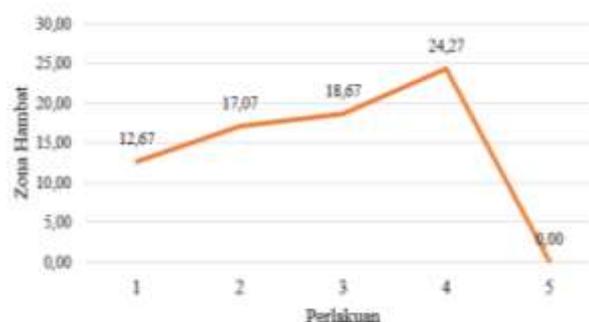
Pengujian antibakteri menggunakan difusi cakram disk bertujuan memastikan sejauh mana pertumbuhan *Escherichia coli* ATCC 25922 dihambat oleh ekstrak daun pasak bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) melalui diameter zona hambat yang dihasilkan.

Pengujian daya hambat dilakukan pada cawan petri menggunakan media MHA (*Mueller Hinton Agar*). MHA dimanfaatkan karena memiliki nutrisi yang cocok untuk mengembangbiakan sebagian besar bakteri, dan tidak mempengaruhi jalan kerja uji yang dilakukan (Utomo, 2018). Zona hambat yang terbentuk di permukaan media dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Diameter Zona Hambat Ekstrak Daun Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) Sumber: Dokumentasi Pribadi, 2023.

Perlakuan variasi konsentrasi dan beserta uji kontrol menghasilkan ukuran diameter zona bening yakni rata-rata konsentrasi 15%, konsentrasi 35%, konsentrasi 55%, dan kontrol positif (*Cloramphenicol*) termasuk ke dalam kategori kuat berturut-turut sebesar 12,67 mm, 17,07 mm, 18,67 mm dan 24,27 mm. Sedangkan P5 merupakan uji kontrol negatif menggunakan pelarut etanol 96% menunjukkan rata-rata sebesar 0 mm.

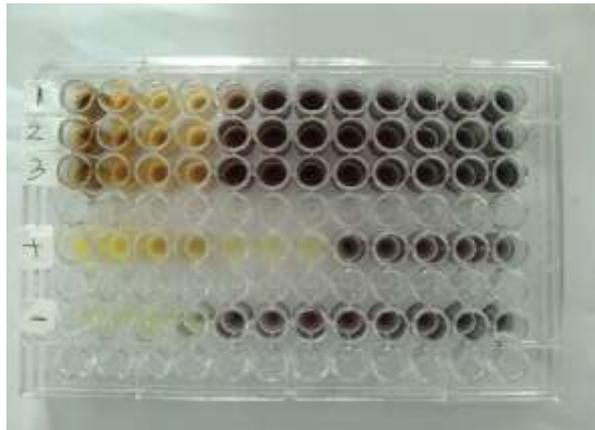


Gambar 4. Grafik Rata-rata Diameter Zona Hambat Ekstrak Daun Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) Sumber: Dokumentasi Pribadi, 2023.

Uji KHM (Konsentrasi Hambat Minimum)

Konsentrasi terkecil pada suatu sumur yang dimana tidak terdapat pertumbuhan mikroba dengan pengamatan secara visual berdasarkan tingkat kejernihan pada setiap perlakuan konsentrasi ekstrak dengan kontrol disebut dengan konsentrasi hambat minimum atau yang disingkat dengan KHM. (Badriyah, 2020).

Adapun media pertumbuhan bakteri ialah *Mueller Hinton Broth* (MHB) terdiri dari ekstrak daging sapi, hidrolisat asam kasein dan pati. Media MHB memungkinkan menjadi media yang cocok untuk pengujian potensi antibiotik metode dilusi cair ataupun difusi cakram pada uji konsentrasi hambat minimum (Nizet, 2017).



Gambar 5. Hasil pengujian KHM
Sumber: Dokumentasi Pribadi, 2023.

Berdasarkan hasil yang telah didapatkan, batas kejernihan kultur pada kolom sumur pengujian ekstrak baris A, B dan C terlihat pada kolom ke-4 dengan konsentrasi sebesar 6,875 $\mu\text{g/mL}$. Sehingga, konsentrasi 6,875 $\mu\text{g/mL}$ dapat dinyatakan sebagai nilai KHM. Hasil uji kontrol positif pada baris E, memperlihatkan batas nilai KHM pada kolom ke-7 atau konsentrasi 0,859 $\mu\text{g/mL}$. Hasil uji kontrol negatif pada baris G sebagai pelarut ekstrak diharapkan tidak dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Tetapi hasil menunjukkan terbentuknya kultur jernih pada kolom 1 sampai dengan 3. Hal ini mungkin saja terjadi karena larutan etanol 96% merupakan golongan etil alkohol yang bersifat antiseptik sehingga dapat melawan mikroorganisme.

PEMBAHASAN

Serangkaian prosedur yang dikenal sebagai pengujian fitokimia digunakan untuk mencatat jenis metabolit sekunder yang ada dalam ekstrak tumbuhan. Skrining fitokimia pada penelitian ini dilakukan secara kualitatif dengan memberikan reagen bertujuan mendeteksi ada atau tidaknya golongan senyawa aktif dalam daun pasak bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) yang memiliki kapasitas sebagai antibakteri. Senyawa bioaktif yang diuji yaitu, alkaloid, fenolik, flavonoid, saponin, steroid, dan triterpenoid.

Hasil pemeriksaan positif mengandung flavonoid dengan perubahan warna menjadi kekuningan dan jernih. Dalam pengujian ini, penggunaan Mg dan HCl sebagai pendeteksi senyawa berguna mereduksi inti benzopiron dalam pada struktur flavonoid dan membentuk garam flavylum (Dewi, 2021). Cara flavonoid bekerja pada bakteri adalah dengan menggunakan protein terlarut dan ekstraseluler untuk menghasilkan senyawa kompleks yang dapat menghalangi membran sel dan melepaskan senyawa intraseluler. Selain itu, menghentikan penggunaan oksigen sehingga terhambatnya pembentukan energi pada membran plasma (Nomer et al., 2019).

Uji kualitatif fenolik membentuk warna hijau pekat karena adanya ion Fe^{3+} pada FeCl_3 bereaksi dengan sampel. Fenolik dapat larut dalam senyawa polar seperti pelarut etanol 96%, senyawa berikatan dengan gula sebagai glikosida yang biasanya ditemukan dalam vakuola sel. Fenolik disebut sebagai

senyawa penyumbang dalam aktivitas antioksidan (Manongko, 2020). Sebagai antibakteri, dapat merusak dinding sel mikroba serta membenamkan protein di dalamnya. Selain itu, fenol memiliki kemampuan untuk mengubah permeabilitas membran bakteri, menginduksi koagulasi protein dan akhirnya menyebabkan lisis membran sel (Hidayah, 2017).

Hasil uji steroid pada sampel menunjukkan warna hijau sebagai tanda positif steroid terkandung dalam daun pasak bumi (*Eurycoma longifolia* Jack). Hal ini sesuai dengan Sulistyarini (2019) yang mengemukakan senyawa steroid diberi asam sulfat pekat guna menghidrolisis air yang berinteraksi dengan turunan asetil yang sebelumnya dihasilkan oleh pereaksi asam asetat anhidrat untuk memproduksi warna hijau atau biru. Membran lipid sensitive terhadap molekul steroid, sehingga sifat antibakterinya mengakibatkan kebocoran pada liposom bakteri. Sifat permeabel yang dimiliki oleh membran fosfolipid sel terhadap senyawa lipofilik mengakibatkan sel rapuh dan lisis (Parubak, 2013).

Penyesuaian kekeruhan suspensi bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 diperlukan sebelum menguji kerentanan antimikroba. Standar Mcfarland merupakan standar umum yang digunakan untuk perbandingan kekeruhan dengan suspensi bakteri dengan kontrol keakuratan menggunakan spektrofotometri. Standar Mcfarland 0,5 sama dengan kepadatan $1,5 \times 10^8$ CFU/mL sebagai standar yang umum digunakan Laboratorium Mikrobiologi dalam percobaan dalam pengujian antibakteri (Aviany, 2020).

Berdasarkan hasil pengukuran zona bening pada agar, menunjukkan ukuran yang bervariasi yakni rata-rata konsentrasi 15%, konsentrasi 35%, konsentrasi 55%, dan kontrol positif (*Chloramphenicol*) termasuk ke dalam kategori kuat berturut-turut sebesar 12,67 mm, 17,07 mm, 18,67 mm dan 24,27 mm. Sedangkan P5 merupakan uji kontrol negatif menggunakan pelarut etanol 96% menunjukkan rata-rata sebesar 0 mm. Intensitas kekuatan hambat masing-masing ekstrak ditentukan berdasarkan pernyataan Winastri (2020) bahwa kategori diameter zona bening pada media yang terbentuk, yaitu ≤ 5 mm = lemah, 6-10 mm = sedang, 11-20 mm = kuat, dan ≥ 21 mm = sangat kuat.

Beragamnya nilai zona hambat yang terukur diakibatkan oleh kuantitas kandungan metabolit sekunder dalam ekstrak daun pasak bumi (*Eurycoma longifolia* Jack). Konsentrasi senyawa pada ekstrak dapat mempengaruhi mekanisme kerjanya pada bakteri (Manalu, 2023). Pernyataan tersebut senada yang dijelaskan oleh Intan (2021) bahwa konsentrasi ekstrak yang digunakan, laju difusi zat antibakteri pada agar, jumlah bakteri pada media kultur, suhu pada saat inkubasi, dan sensitivitas terhadap pertumbuhan bakteri serta interaksi antara senyawa metabolit sekunder dengan media adalah faktor-faktor penyebab diameter zona bening. Egra (2019) menambahkan perbedaan struktur dinding sel bakteri dapat menjadi faktor penentuan aktivitas, penetrasi dan ikatan senyawa antibakteri. Kekeruhan suspensi bakteri juga menjadi faktor penyebab adanya perbedaan nilai hambat. Diameter zona hambat yang besar, ketika suspensi kurang keruh. Di sisi lain, hasil diameter zona hambat yang kecil ketika suspensi lebih keruh (Oktavia, 2023).

Zona hambat yang terbentuk karena adanya kontrol positif *Chloramphenicol* 30 μ g memperlihatkan hasil positif dalam menghambat aktivitas pertumbuhan bakteri sebagai antibiotik. *Chloramphenicol* digunakan sebagai pembanding dikarenakan antibiotik bakteriostatik artinya menghambat pertumbuhan bakteri yang bersifat berspektrum luas terhadap bakteri aerobik dan anaerobik dengan gram positif dan negatif (Nugraha, 2023). Perlakuan kontrol negatif menggunakan larutan etanol 96% yang mana digunakan sebagai pelarut pada proses maserasi. Perlakuan tersebut tidak menunjukkan adanya tindakan dalam menekan pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 sehingga tidak ada pembentukan zona hambat di daerah cakram.

Aktivitas farmakologis yang dilakukan oleh senyawa flavonoid, fenolik dan steroid yang ada pada daun pasak bumi (*Eurycoma longifolia* Jack), terbukti memiliki mekanisme antibakteri dengan menghambat ketahanan permeabilitas dinding sel dan protein dinding sel, serta menghambat metabolisme sel. Sejalan dengan pendapat Egra (2019) bahwa sementara flavonoid dapat melewati peptidoglikan polar, fenolik dapat mengganggu unsur-unsur penyusun peptidoglikan sel. Steroid dapat memodifikasi membran sel menyebabkan sel rapuh dan lisis (Anggraini, 2019).

Penentuan KHM dilakukan dengan menguji ekstrak daun pasak bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) terhadap perkembangbiakan bakteri *Escherichia coli* pada media *Mueller Hinton Broth*. Alat yang digunakan dalam uji ini ialah *microplate 96 well* dengan metode mikrodilusi cair. Metode mikrodilusi digunakan untuk menentukan KHM suatu zat antimikroba yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhannya (Efendi, 2013).

Status pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan melihat kejernihan pada tiap sumur untuk menetapkan nilai KHM setelah diinkubasi dan diberi reagen MTT (*Metythiazol Tetrazolium*). Keberadaan reagen MTT membantu dalam penentuan nilai KHM, apabila pada sumur berwarna ungu maka terdapat bakteri yang menandakan konsentrasi tertentu pada larutan uji tidak dapat menghambat pertumbuhan suatu bakteri. Tiap sumur yang telah diberi MTT bereaksi dengan sel hidup kemudian membentuk kristal formazan berwarna ungu. Sel yang masih hidup dipecah oleh sistem reduktase suksinat tetrazolium melalui reaksi reduksi (Mahfur, 2016).

Meskipun kontrol negatif memberikan hasil perubahan kultur menjadi jernih, Jing *et al.* (2020) menerangkan etanol efektif bekerja sebagai disinfektan pada konsentrasi 60-85%. Sejalan dengan pernyataan tersebut, Ivanka (2022) melaporkan senyawa etanol termasuk golongan alkohol yang berguna sebagai antiseptik. Namun, terdapat batas konsentrasi tertentu golongan alkohol dapat bekerja secara efektif sebagai disinfektan yakni pada konsentrasi 60-90%. Menurut dua pernyataan yang telah disebutkan, dalam proses uji KHM memungkinkan terjadinya kesalahan pada perlakuan kontrol negatif, seperti tip mikropipet yang telah digunakan untuk perlakuan kontrol positif luput diganti dengan tip yang baru sebagai aplikator mengambil dan memasukkan larutan etanol 96% pada sumuran.

KESIMPULAN

Berdasarkan beragam uji yang telah dilaksanakan, maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Ekstrak Daun Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) mampu menghambat pertumbuhan *Escherichia coli* ATCC 2522. Hal ini ditunjukkan hasil analisis statistik dengan nilai signifikansi 0.001 dan probabilitas <0.05, maka H_0 ditolak dan H_a diterima.
2. Konsentrasi minimum ekstrak Daun Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) menggunakan pelarut etanol 96% dalam menekan pertumbuhan *Escherichia coli* ATCC 25922 sebesar 6,875 $\mu\text{g/mL}$ menggunakan metode mikrodilusi *microplate 96-well*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Dosen Pembimbing, Bapak Dr. H. Akhmad, M. Kes., Balai Besar Pengujian, Standardisasi dan Instrumen Lingkungan Hidup Kota Samarinda, serta seluruh pihak yang membantu penulis atas kerja sama dan bimbingan yang diberikan.

DAFTAR PUSTAKA

- Alviani, S., R. F. Adelia., Yulida A., dan U. Amna. 2022. Skrining Fitokimia Ekstrak Daun Benalu Kopi (*Scurulla Oarasirica* L.) Dataran Tinggi Gayo. *Quimica: Jurnal Kimia Sains dan Terapan*. 4(1): 9-14. <https://doi.org/10.33059/jq.v4i1.4360>.
- Anggraini, W., S. C. Nisa., R. Ramadhani DA, dan B. Ma'arif ZA. 2019. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol 96% Buah Blewah (*Cucumis melo* L. var. *cantalupensis*) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli*. *Pharmaceutical Journal of Indonesia*. 5(1): 61–66. <https://pji.ub.ac.id/index.php/pji/article/view/168>.
- Ariani, P. 2016. *Diare Pencegahan dan Pengobatan*, Yogyakarta: Nuha Medika
- Aviany, H. B., dan S. Pujiyanto. 2020. Analisis Efektivitas Probiotik di Dalam Produk Kecantikan sebagai Antibakteri terhadap Bakteri *Staphylococcus epidermidis*. *Berkala Bioteknologi*. 3(2): 24–31. <https://ejournal2.undip.ac.id/index.php/bb/article/view/9657>.
- Badriyah, S., dan C. I. N. H. Safitri. 2020. Aktivitas Kombinasi Ekstrak Daun Sirih Hijau dan Kunyit terhadap *Candida albicans* Secara Mikrodilusi. *Artikel Pemakalah Paralel*. 5(2): 519–526.

<https://publikasiilmiah.ums.ac.id/xmlui/handle/11617/12310>.

- Dewi, I. S., T. Septawati dan F. A. Rachma. 2021. Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Kulit dan Biji Terong Belanda (*Solanum betaceum* Cav.). Prosiding Seminar Nasional UNIMUS. 4: 1210–1218. <https://prosiding.unimus.ac.id/index.php/semnas/article/view/894>
- Efendi, Y. N., dan T. Hertiani. (2013). Potensi Antimikroba Ekstrak Etanol Sarang Semut (*Myrmecodia tuberosa* Jack.) terhadap *Candida albicans*, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus*. *Traditional Medicine Journal*. 18(1): 53–58. <https://doi.org/10.22146/tradmedj.7944>
- Egra, S., Mardhiana, M. Rofin., M. Adiwena., N. Jannah., H. Kuspradini., dan T. Mitsunaga. 2019. Aktivitas Antimikroba Ekstrak Bakau (*Rhizophora mucronata*) dalam Menghambat Pertumbuhan *Ralstonia solanacearum* Penyebab Penyakit Layu. *Agrovigor: Jurnal Agroekoteknologi*. 12(1): 26 – 31. <https://doi.org/10.21107/agrovigor.v12i1.5143>
- Hidayah, N., D. Mustikaningtyas., dan S. Bintari. 2017. Aktivitas Antibakteri Infusa Simplisia *Sargassum muticum* terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. *Life Science*. 6(2): 49–54. <https://journal.unnes.ac.id/sju/index.php/UnnesJLifeSci/article/view/25345>.
- Hutasoit, D. P. 2020. Pengaruh Sanitasi Makanan dan Kontaminasi Bakteri *Escherichia coli* Terhadap Penyakit Diare, *Jurnal Ilmiah Kesehatan Sandi Husada*, 12(2): 779–786. <https://doi.org/10.35816/jiskh.v12i2.399>.
- Intan, K., A. Diani, dan A. S. R. Nurul. 2021. Aktivitas Antibakteri Kayu Manis (*Cinnamomum burmanii*) terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Kesehatan Perintis*. 8(2): 121–127. <https://doi.org/10.33653/jkp.v8i2.679>.
- Ivanka, M. D., dan I. M. Puspitasari. 2022. Artikel Review: Mekanisme Kerja Bahan Penyusun Utama Antiseptik dan Desinfektan Dalam Menurunkan Risiko Penularan Covid-10 Bagi Tenaga Kesehatan Di Rumah Sakit. *Farmaka*. 20(3): 63–74. <https://doi.org/10.24198/farmaka.v20i3.39796>
- Jing, J. L. J., T. P. Yi., R. J. C. Bose., J. R. McCarthy., N. Tharmalingan., dan T. Madheswaran. 2020. Hand Sanitizers: A Review on Formulation Aspects, Adverse Effects, and Regulations. *International journal of environmental research and public health*. 17(9): 3326. <https://doi.org/10.3390/ijerph17093326>
- Mahfur. 2016. Uji sitotoksik fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) terhadap sel kanker T47D dengan metode 3-(4,5 dimetiltiazol -2-il)-2,5 difenil tetrazolium bromide (MTT). *Jurnal Unikal*. 57–63. <http://dx.doi.org/10.31941/jurnalpena.v33i2.497>
- Manalum, M., D. Adityarini, dan A. Prasetyaningsih/ 2023. Pengaruh Aasam Sitrat Terhadap Aktovitas Antioksidan dan Antibakteri pada Telang (*Clitoria ternatea* L.). *Metamorfosa: Journal of Biological Sciences*. 10(1): 223-231. <https://doi.org/10.24843/metamorfosa.2023.v10.i02.p05>
- Manongko, P. S., M. S. Sangi., dan L. I. Momuat. 2020. Phytochemical Compound Test and Antioxidant Activity of Broken Bone Plants (*Euphorbia tirucalli* L.). *Jurnal MIPA*. 9(2): 64-69. <https://doi.org/10.35799/jmuo.9.2.2020.28725>
- Menteri Kesehatan Republik Indonesia. 2017. Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 32 Tahun 2017 Tentang Standar Baku Mutu Kesehatan Lingkungan Dan Persyaratan Kesehatan Air Untuk Keperluan Higiene Sanitasi, Kolam Renang, Solus Per Aqua dan Pemandian Umum. Kementrian Kesehatan, Jakarta.
- Mozartha, M., P. Silvia., dan B. Sujatmiko. 2019. Perbandingan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Curcuma zedoaria dan Bahan Irigasi Natrium Hipoklorit 2.5% terhadap *Enterococcus faecalis*. *Jurnal Material Kedokteran Gigi*. 8(1): 22-29. <https://doi.org/10.32793/jmkg.v8i1.330>.
- Nizet V. 2017. The Accidental Orthodoxy of Drs. Muellerand Hinton. *Ebiomedicine*. 22: 26-27. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.07.002>
- Nomer, N. M. G. R., A. S. Duniaji., dan K. A. Nocianitri. 2019. Kandungan Senyawa Flavonoid Dan Antosianin Ekstrak Kayu Secang (*Caesalpinia sappan* L.) Serta Aktivitas Antibakteri Terhadap *Vibrio cholerae*. *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Pangan (ITEPA)*. 8(2): 216.

- <https://doi.org/10.24843/itepa.2019.v08.i02.p12>
- Nugraha, Y. R., N. A. Erlinawati, dan S. E. Dewi. 2023. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etil Asetat Bonggol Pisang Kepok (*Musa Paradisiaca* L.) Terhadap Bakteri *Staphylococcus Aureus* Dan *Escherichia Coli*. *Medika Farmaka*. 1(1): 40-53. <https://doi.org/10.33482/jmedfarm.v1i01.4>
- Oktavia, A. D., D. Nawangsari., dan G. Samodra. 2023. Uji Aktivitas Antibakteri dan Stabilitas Pasta Gigi Ekstrak Daun Bidara (*Ziziphus mauritiana* Lam) Terhadap Pertumbuhan *Streptococcus Mutans*. *Metamorfosa: Journal of Biological Sciences*. 10(1): 312-323. <https://doi.org/10.24843/metamorfosa.2023.v10.i02.p15>
- Parubak, S. A. 2013. Senyawa Flavonoid yang Bersifat Antibakteri dari Akway (*Drimys becariana*. Gibbs). *CHEMISTRY PROGRESS*. 6(1): 34–37. <https://doi.org/10.35799/cp.6.1.2013.2069>
- Qisti, D., E. Putri., H. Fitriana., S. Irayani., dan S. Pitaloka. 2021. Analisis Aspek Lingkungan Dan Perilaku Terhadap Kejadian Diare Pada Balita Di Tanah Sareal. *Jurnal Inovasi Penelitian*. 2(6): 1661-1668. <https://doi.org/10.47492/jip.v2i6.956>
- Radji, M. 2009. *Buku Ajar Mikrobiologi Panduan Mahasiswa Farmasi dan Kedokteran*, Jakarta: EGC
- Rahayu, W.P., S. Nurjanah., dan E. Komalasari. 2018. *Escherichia coli: Patogenitas, Analisis dan Kajian Risiko*, Bogor: IPB Press
- Silalahi, M. dan Nisyawati. 2015. Etnobotani Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia*) pada Etnis Batak, Sumatera Utara. Prosiding Seminar Nasional Masyarakat Biodiversitas Indonesia, Program Biologi Konservasi, Departemen Biologi FMIPA UI, Depok, Jawa Barat. 1(4): 743–746. <https://doi.org/10.13057/psnmbi/m010410>
- Sulistyarini, I., D. A. Sari dan T. A. Wicaksono. 2019. Skrining Fitokimia Senyawa Metabolit Sekunder Batang Buah Naga (*Hylocereus polyrhizus*). *Jurnal Ilmiah Cendekia Eksakta*. 5(1): 56–62. <http://dx.doi.org/10.3194/ce.v5i1.3322>
- Supartini, S., dan D. D. N. Cahyono. 2020. Rendemen Akar, Batang dan Daun Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) Sebagai Bahan Baku Obat Herbal. *Jurnal Riset Teknologi Industri*. 14(2): 142. <https://doi.org/10.26578/jrti.v14i2.5788>
- Utomo, S. B., M. Fujiyanti., W. P. Lestari., dan S. Mulyani. 2018. Antibacterial Activity Test of the C-4-methoxyphenylcalix[4]resorcinarene Compound Modified by Hexadecyltrimethylammonium-Bromide against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* Bacteria. *JKPK*. 3(3): 201-209. <https://doi.org/10.20961/jkpk.v3i3.22742>
- Winastri, N. L. A. P., H. Muliastri., dan E. Hidayati. 2020. Aktivitas Antibakteri Air Perasan Dan Rebusan Daun Calincing (*Oxalis corniculata* L.) Terhadap *Streptococcus mutans*. *Berita Biologi*. 19(2): 223-230. <https://doi.org/10.14203/beritabiologi.v19i2.3786>