



UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL DAUN LEGUNDI (*Vitex trifoli* Linn) TERHADAP BAKTERI *ESCHERICHIA COLI*

Heni Supiana

Program Studi Farmasi, Fakultas Kesehatan Universitas Nahdlatul Ulama Nusa Tenggara Barat. Email:
henisupiana2@gmail.com

ABSTRAK

Penyakit diare sering terjadi di Indonesia. Diperlukan penanganan dan pencegahan penyakit diare tanpa tergantung pada konsumsi obat-obatan kimia, yaitu penggunaan obat tradisional. Berdasarkan penelitian dengan metode metode eksperimental, disimpulkan bahwa variasi konsentrasi ekstrak daun legundi (*vitex trifoli L*) memiliki pengaruh daya hambat terhadap bakteri *E.coli*. Semakin besar konsentrasi maka semakin tinggi daya hambat terhadap bakteri *E.coli*. Pada konsentrasi 10% memiliki diameter zona hambat 0 mm dengan kategori lemah, konsentrasi 20% memiliki diameter zona hambat 27 mm dengan kategori kuat, konsentrasi 30% memiliki diameter zona hambat 29 mm dengan kategori kuat, konsentrasi 40% memiliki diameter zona hambat 31 mm dengan kategori kuat, konsentrasi 50% memiliki konsentrasi 32 mm dengan kategori kuat, dan konsentrasi 60% memiliki diameter zona hambat 34 mm dengan kategori kuat. Disarankan untuk penelitian selanjutnya perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengembangkan daun legundi (*vitex trifoli L*) sebagai antibakteri terhadap bakteri lainnya dan menggunakan konsentrasi lebih tinggi dan mengembangkan daun legundi (*vitex trifoli L*) sebagai sediaan formulasi dan sediaan farmasi.

Kata Kunci: bakteri escherichia coli, diare, daun legundi

A. LATAR BELAKANG

Bakteri *escherichia coli* merupakan parasit yang paling sering menyerang mukosa lambung sehingga menyebabkan penyakit diare. Bakteri ini biasanya ditemukan pada makanan. Selain disebabkan oleh bakteri penyakit diare juga disebabkan oleh faktor lingkungan yang kurang bersih (Mayaserli dan Anggraini, 2019).

Seringnya penanganan dan pencegahan penyakit diare di Indonesia dilakukan dengan mengkonsumsi obat-obatan kimia. Padahal, konsumsi obat kimia secara berlebihan atau tidak sesuai dengan anjuran dokter akan berdampak tidak baik bagi yang mengkonsumsi, dikarenakan bahan kimia yang terkandung dalam obat tersebut mempunyai efek samping yang berdampak pada kesehatan. Diperlukan penggunaan obat tradisional sebagai salah satu solusi untuk mengurangi penggunaan obat-obatan kimia. Salah satu obat tradisional yang tersedia di Indonesia adalah daun legundi (*Vitex trifoli L.*). Tanaman daun legundi atau yang di kenal dengan nama daun lego bagi masyarakat Lombok Nusa Tenggara Barat tumbuh diberbagai daerah.

Masih banyaknya kasus penyakit diare di Indonesia dan perlunya penanganannya dengan mempergunakan pengobatan tradisional melatarbelakangi perlunya penelitian untuk menguji aktivitas antibakteri dan menguji konsentrasi ekstrak etanol daun legundi sebagai antibakteri terhadap *escherichia coli*. Adapun hipotesis yang diajukan dalam penelitian ini adalah:

- H_a : daun legundi mampu menghambat bakteri *Escherichia coli* sebagai penyebab penyakit diare.
- H_0 : daun legundi tidak dapat menghambat bakteri *Escherichia coli*.

B. METODE PENELITIAN

Metode penelitian yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimental yaitu dengan percobaan di laboratorium. Rancangan penelitian yang digunakan adalah RAL (Rancangan Acak Lengkap) dimana RAL ini akan diberikan perlakuan secara acak pada seluruh unit percobaan, karna lingkungan tempat percobaan relative homogeny sehingga media atau tempat percobaan tidak memberikan pengaruh pada respon yang diamati. Pengulangan dilakukan selama tiga kali untuk mendapatkan nilai yang diinginkan.

P1 = Ampisillin dan Aquades

P2 = 5%

P3 = 15%

P4 = 30%

P5 = 50%

P6 = 65%

Populasi sampel tanaman legundi (*vitex trivoli linn*) yang diambil di Desa Montong Are, Kecamatan Kediri Nusa Tenggara Barat. Alat dan Bahan Pembuatan Simplisia

Alat	Bahan
<ul style="list-style-type: none"> • Cuter • Timbangan digital • Blender • Nampan • Ayakan 	<ul style="list-style-type: none"> • Daun legundi • Air

Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak

Alat	Bahan
<ul style="list-style-type: none"> • Alat gelas • Kertas Saringan • Aluminium foil • Pemanas elektrik • Evaporator • Cawan porselen • Batang pengaduk 	<ul style="list-style-type: none"> • simplisia daun legundi • etanol • aquades

Penelitian ini juga mempergunakan alat dan bahan uji bebas etanol. Etanol yang digunakan adalah etanol yang sudah steril. Etanol digunakan sebagai bahan pelarut pada sampel dalam metode maserasi. Adapun alat dan bahan screening fitokimia yang dipergunakan adalah:

Alat	Bahan
<ul style="list-style-type: none"> • Gelas ukur • Pipet tetes • Tabung reaksi 	<ul style="list-style-type: none"> • Asam sulfat (H₂SO₄) • Pereaksi dragendorf • Wagner dan mayer • Senyawa saponin (Aquades) • Senyawa flavonoid (NaOH, CH₃COOH₃, HCl, Mg, H₂SO₄) • Senyawa tannin (FeCl₃) • Senyawa steroid (kloroform, CH₃COOH₃, H₂SO₄ dan asam glacial)

Kemudian, alat dan bahan uji mikrobiologi yang dipergunakan adalah:

Alat	Bahan
------	-------

<ul style="list-style-type: none"> • Auto clave • Cawan petri • Tabung reaksi • Jarung ose • Rak tabung reaksi • Oven • Inkas • Lampu Bunsen • Mikroskop • Lemari asam • Evaporator • Spatula • Pipet • Pengukur suhu • Timbangan analitik • Hot plate • Beaker glass • Erlen mayer 	<ul style="list-style-type: none"> • Natrium Agar (NA) • Aquades • Spiritus • Alcohol • Ampicillin • Ekstrak daun legundi • Etanol • Natrium klorida (NaCl)
---	---

Peneitian dilaksanakan pada bulan Juli – Agustus 2022 di Laboratorium Fakultas MIPA, Fakultas Matematika Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Mataram. Adapun variabel bebas dari penelitian ini yaitu ekstrak daun legundi dengan konsentrasi 5%, 15%, 30%, 50%, 65%, kontrol positif (Ampicillin) dan kontrol negatif (aquades), sedangkan variabel terikatnya adalah pengukuran zona hambat ekstrak daun legundi pada media agar terhadap bakteri *Escherchia Coli*.

Langkah-langkah penelitian:

1. Penyiapan sampel
Daun legundi (*vitex trifoli linn*) dipetik dari pohonnya, kemudian dipisahkan daun legundi dari batangnya. Dikumpulkan jadi satu dan ditempatkan menggunakan karung atau wadah.
2. Sortasi basah
Dilakukan pemisahan benda asing atau kotoran yang terdapat pada daun legundi (*vitex trifoli linn*).
3. Pencucian
Daun legundi (*vitex trifoli linn*) dicuci dengan air mengalir untuk membersihkan sisa – sisa kotoran.
4. Perajangan
Daun legundi (*vitex trifoli linn*) yang sudah memalui proses pencucian, dipotong – potong kecil untuk membantu dalam proses penggilingan atau penghalusan dan membantu mempercepat pengeringan.
5. Pengeringan
Daun legundi (*vitex trifoli linn*) yang telag dirajang dikeringkan dengan menggunakan metode diangin – anginkan sampai daun legundi (*vitex trifoli linn*) kering dan kadar air kurang dari 10%.
6. Sortasi kering
Daun legundi (*vitex trifoli linn*) yang sudah kering dipisahkan dari sisa kotoran atau benda asing yang terdapat pada daun legundi (*vitex trifoli linn*).
7. Penyimpanan
Daun legundi (*vitex trifoli linn*) yang sudah kering dimasukkan kedalam wadah, lalu ditutup dengan rapat. Daun legundi (*vitex trifoli linn*) yang telah disimpan diberi label.
8. Pemeriksaan mutu

Ambillah sampel daun legundi (*Vitex trifoli linn*) yang sudah kering, kemudian dihaluskan menggunakan blender sampai dengan tingkat kehalusan yang diinginkan. Lakukan uji kandungan dengan metode yang dipersiapkan.

C. ANALISIS DAN PEMBAHASAN

1. Diare dan Kandungan Senyawa Aktif Buah Legundi (*Vitex trifolia* Linn.)

Diare adalah salah satu penyakit yang disebabkan karena jumlah bakteri *Escherichia coli* yang berlebihan, juga dapat terjadi infeksi apabila menyebar menuju sistem/organ tubuh, seperti infeksi pada saluran kemih/kencing (Sutiknowati, 2016). Kesalahan makanan, infeksi bakterial, infeksi viral dan infeksi parasite gastrointestinal adalah termasuk faktor penyebab diare. Perubahan frekuensi defekasi, konsistensi feses dan gerak peristaltik usus merupakan bentuk dari penyakit diare (Dewandaru, 2019).

✓ **Klasifikasi diare**

- diare akut
keluarnya tinja cair tanpa darah selama 7-14 hari.
- diare kronis
keluarnya tinja cair selama 14 hari atau lebih dan dapat disertai darah atau tidak. Diare kronis dalam waktu lama akan mengakibatkan dehidrasi.
- diare disentri
Keluarnya tinja sedikit-sedikit dan sering mengeluh sakit perut saat BAB. Diare disentri dapat mengakibatkan anoreksia, kehilangan berat badan yang cepat, dan kerusakan mukosa usus karena bakteri.

Buah Legundi (*Vitex trifolia* Linn.) mengandung senyawa golongan flavonoid (kastisin; 3,6,7-trimetil kuersetagenin; vitexin; artemetin; 5-metil artemetin; 7-desmetil artemetin; luteolin; luteolin-7-O-²-D-glukuronida; luteolin-3-O-²-D-glukuronida dan isoorientin), labdane diterpene (vitexilactone dan revitexilactone), asam fenolik (asam p-hidroksbenzoik dan asam vanilik), falovon (casticin, luteolin dan artemetin), asam p-hidrobenzoik, b-sitosterol, b-sitosterol-3-O-glukosida, casticin, 3,6,7-trimethyl quercetagenin, vitexfolins A-C, flavonoids 12 (luteolin, crysosplenol D dan penduletin), halimane diterpenes (vitetrifolins D-G), terpenoid, maupun sterol (²-sitosterol dan ²-sitosterol-²-D-glukosida). Selain kandungan di atas, buah legundi (*Vitex trifolia* Linn.) juga mengandung alkaloid vitricine (0,01%) (Geetha et al. 2004).

2. Pembuatan Ekstrak Daun Legundi (*Vitex trifoli* Linn)

1. Maserasi

Simplisia daun legundi (*Vitex trifoli* Linn) yang sudah dihaluskan sebanyak 1000 gr dimasukkan ke dalam gelas kimia kemudian di tuangkan etanol 96% sebagai pelarutnya sebanyak 2,5 liter di maserasi selama 3 hari.

2. Ekstraksi

Melakukan proses penyaringan untuk mendapatkan ekstrak cair dari simplisia daun legundi (*Vitex trifoli* Linn). Dan untuk mendapatkan ekstrak pekat dilanjutkan dengan evaporasi.

3. Uji senyawa fitokimia

1. Alkaloid

Sebanyak 2 mL ekstrak daun legundi ditambah 5 mL kloroform dan beberapa tetes amoniak. Fraksi kloroform dipisahkan dan diasamkan dengan H₂SO₄ 2 M. Fraksi asam di bagi menjadi 3 bagian, kemudian ditambahkan pereaksi Dragendorff pada bagian I, Meyer pada bagian II, dan Wagner pada bagian III. Terbentuknya endapan

merah pada pereaksi Dragendorf, endapan putih pada pereaksi Meyer, dan endapan coklat pada pereaksi Wagner ditandai adanya alkaloid.

2. Flavonoid

2 mL ekstrak daun legundi ditambahkan 3 mL air, kemudian dipanaskan selama 5 menit, disaring, dan diambil filtratnya. Filtrat ditambahkan serbuk Mg, 1 mL HCl pekat, dan 1 mL amil alkohol. Campuran dikocok kuat-kuat. Perubahan warna merah, kuning, atau jingga pada lapisan amil alkohol ditandai adanya flavonoid .

1. Saponin

2 mL ekstrak daun legundi ditambahkan air dan dididihkan beberapa menit. Kemudian disaring dan filtratnya dikocok. Terbentuknya busa yang stabil selama 10 menit setelah pengocokkan menunjukkan saponin.

2. Tanin

2 mL ekstrak daun legundi ditambahkan air dan dididihkan beberapa menit. Kemudian disaring dan filtratnya ditambah FeCl 3 1% (b/v). Tanin ditandai dengan warna biru tua atau hitam kehijauan.

3. Steroid dan Triterpenoid

2 mL ekstrak daun legundi ditambahkan 5 mL etanol 30% kemudian dipanaskan selama 5 menit dan disaring. Filtratnya diuapkan lalu ditambah eter. Lapisan eter ditambah pereaksi Lieberman Buchard. Warna merah atau ungu menunjukkan triterpenoid. Warna hijau atau biru menunjukkan steroid.

4. Uji Antibakteri

Media nutrient agar sebanyak 27 gr dan aquades sebanyak 750 gr dilarutkan di atas hotplate. Nutrient agar yang sudah larut di dinginkan selama 1 menit lalu di tuangkan kedalam cawan petri dengan ketebalan 4-5 mm. Diamkan selama 1 x 24 jam untuk melihat kontaminasi atau tidak. Setelah itu, ambil 2-3 ose suspensi bakteri *Escherichia coli*, campurkan ke dalam 10 ml aquades dengan standar kekeruhan barium clorida (BaCl₂) 0,5 Microfiltration (MF). Kemudian oleskan ke media agar menggunakan kapas steril, lalu buat sumuran dengan blue tip, setelah itu masukkan masing-masing ekstrak daun legundi (*Vitex trifoli* Linn) sebanyak 50 mikron, kontrol positif (ampicillin) dan kontrol negatif (aquades) dalam media, lalu di inkubasi selama 1 x 24 jam dengan suhu 27°C. Diberikan ekstrak dengan konsentrasi 5%, 15%, 30%, 50%, 65%. Setelah itu amati aktivitas bakteri yang terjadi di dalam masing-masing perlakuan dan diukur dengan menggunakan jangka sorong (mm).

5. Pengambilan sampel

Pengambilan sampel daun legundi dilakukan pada sore hari pukul 16.00 wita.

Pengambilan sampel daun legundi pada sore hari dimaksud agar air embun yang ada pada daun tersebut dapat hilang atau berkurang pada daun. Hal ini dilakukan untuk mendapatkan daun legundi yang sesuai dengan keinginan. Daun legundi yang diambil dipetik dari pucuk ke bawah batangnya sebanyak 5 lembar.

6. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan untuk mengetahui kebenaran identitas tanaman legundi (*vitex trifoli* L), sehingga dapat menghindari kesalahan dalam pengambilan sampel (Diniatik, 2015). Sampel yang dibawa yakni tanaman legundi yang masih utuh yang berupa akar, batang, daun. Determinasi tanaman dilakukan di laboratorium TERPADU Jurusan Biologi Lanjut Universitas Islam Negeri Mataram. Dari hasil determinasi menunjukkan bahwa nama ilmiah atau nama latin sampel (*Specimen*) tersebut adalah legundi (*vitex trifoli* L).

7. Pembuatan Simplisia Daun Anting-Anting (*Acalypha Indica* L)

1. Pengumpulan Sampel

Bagian tanaman yang digunakan yaitu daun yang masih muda dan segar, diambil dengan cara dipetik langsung dan dibutuhkan sebanyak 2 kg daun legundi (*vitex trifoli L*).

2. Sortasi Basah

Daun anting-anting di sortasi dengan cara manual yaitu dengan menghilangkan bahan atau benda asing seperti tanah dan tumbuhan lainnya yang menempel pada daun legundi (*vitex trifoli L*).

3. Pencucian

Pencucian daun legundi (*vitex trifoli L*) untuk membersihkan tanaman lain atau pengotor lainnya yang masih menempel. Di bersihkan menggunakan air mengalir.

4. Pengeringan

Pengeringan daun legundi (*vitex trifoli L*) dilakukan dengan cara diangin-anginkan selama 14 hari di dalam ruangan dengan suhu 25°C dan terlindung dari cahaya matahari. Pengeringan pada daun legundi (*vitex trifoli L*) sebanyak 2000 gram, kemudian berat simplisia kering pada daun didapatkan sebanyak 1000 Gram gram sehingga susut pengeringannya 50%.

5.
$$\begin{aligned} \text{Susut Pengeringan} &= \frac{2000 \text{ gr} - 1000 \text{ gr}}{2000 \text{ gr}} \times 100\% \\ &= 50\% \end{aligned}$$

6. Pembuatan Serbuk Simplisia

Pembuatan serbuk simplisia daun legundi (*vitex trifoli L*), menggunakan blender. Simplisia yang sudah kering dimasukkan keblender dan dihaluskan. Serbuk yang dihasilkan sebanyak 149 gram. Pembuatan serbuk simplisia bertujuan untuk memperbesar luar permukaan sehingga mempercepat proses ekstraksi karena dengan memperbesar luas permukaan akan memperbesar kontak antara serbuk dan pelarut semakin besar (Sa'adah dan Nurhasnawati, 2015).

8. Ekstraksi Daun legundi (*vitex trifoli L*)

Ekstraksi daun legundi (*vitex trifoli L*) bertujuan untuk memperoleh senyawa aktif yang ada pada simplisia daun legundi (*vitex trifoli L*) yakni Flavonoid dan tanin. Pembuatan ekstraksi daun legundi (*vitex trifoli L*) menggunakan metode maserasi. Dilakukan dengan cara merendam 149 gram serbuk simplisia daun legundi (*vitex trifoli L*) dengan menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 1500 ml. Perendaman dilakukan selama 3x24 jam.

Kemudian dilanjutkan dengan proses penyaringan. Proses penyarian dilakukan dengan cara serbuk simplisia yang sudah diekstraksi selama 3x24 jam, kemudian disaring menggunakan kertas saring dan erlenmayer 1000 ml sebagai wadah. Tujuan penyaringan adalah untuk memisahkan ekstrak dengan ampas, sehingga dihasilkan maserat sebanyak 1000 ml. selanjutnya maserat tersebut dipekatkan dengan *rotary evaporator* dengan suhu 40°C selama 2 jam. Dan dilakukan penguapan dengan menggunakan vacum hingga diperoleh ekstrak kental sebanyak 30 ml.

a. Senyawa Pada Tanaman Anting-Anting

1. Tanin

Senyawa tanin merupakan senyawa polar dengan gugus hidroksi. Senyawa tanin dapat terekstrak dan larut dalam pelarut polar seperti metanol, etanol (Halimu dkk, 2017). Mekanisme kerja tanin sebagai antibakteri pengendapan protein bakteri sehingga terjadi inaktivasi enzim yang diproduksi bakteri dan menginaktivasi protein transport dinding sel bakteri sehingga merusak dinding sel bakteri (Artanti, 2020).

b. Sifat Antibakteri

Sifat antibakteri yang digunakan yakni bakteriostatik, dimana bakteriostatik hanya menghambat pertumbuhan bakteri. Terlihat pada ekstrak daun legundi (*vitex trifoli L*) bersifat bakteriostatik terhadap bakteri *E.coli* (Purnamaningsih dkk, 2017).

c. Uji Kadar Air

Uji kadar air menggunakan metode pemanasan dengan cara diangin-anginkan. Sampel yang digunakan sebanyak 2 kg daun legundi (*vitex trifoli L*) kemudian diangin-anginkan didalam ruangan dengan suhu ruang 25°C dan terlindung dari cahaya matahari selama 14 hari hingga mengering. Kemudian timbang sampel daun legundi (*vitex trifoli L*) yang sudah diangin-anginkan (Selawa dkk, 2013).

Dengan rumus sebagai berikut:

Keterangan:

$$\text{Kadar Air} = \frac{A - B}{A} \times 100\%$$

A = Berat sampel sebelum dipanaskan

B = Berat sampel setelah dipanaskan

$$\begin{aligned} \text{Kadar Air} &= \frac{\text{---}}{\text{---}} \times 100\% \\ &= 50\% \quad \left(\frac{1000 \text{ gr} - 1000 \text{ gr}}{2000 \text{ gr}} \right) \end{aligned}$$

d. Uji Kadar Abu

Uji kadar abu dilakukan untuk memberikan gambaran kandungan mineral internal dan eksternal dari suatu simplisia. Uji kadar abu dilakukan dengan cara menimbang daun legundi (*vitex trifoli L*) sebanyak 16,66 gr dan menimbang cawan porselin. Setelah itu panaskan cawan porselin pada tanur dengan suhu 105°C selama 1 jam. Kemudian didinginkan selama 30 menit. Kemudian dimasukkan 16,66 gram sampel daun legundi (*vitex trifoli L*) kedalam cawan porselin. Timbang cawan yang sudah berisi sampel daun tersebut, setelah itu dilanjutkan dengan memasukkan cawan porselin ke dalam alat tanur dengan suhu 600°C selama 6 jam. Kemudian cawan porselin dan sampel yang sudah menjadi abu didinginkan dan menimbang hasil kadar abu pada sampel tersebut (Febriansyah dkk, 2019).

$$\text{Kadar Abu (\%)} = \frac{\text{Berat Abu}}{\text{Berat Sampel}} \times 100\%$$

$$\begin{aligned} &= 60,02\% \\ &\quad \left(\frac{10 \text{ gr}}{16,66 \text{ gr}} \right) \end{aligned}$$

e. Uji Bebas Etanol

Pada uji bebas etanol dilakukan dengan cara 2 ml ekstrak daun legundi (*vitex trifoli* L) disiapkan ditabung reaksi, ditambah 1 ml NaOH 1 N dan ditambah 1 ml iodium 0,1 N. Menurut (Sumiati, 2014), mengatakan apabila tidak ada endapan berwarna kuning, maka ekstrak tersebut bebas etanol.

Hasil uji bebas etanol yang telah dilakukan pada ekstrak daun legundi (*vitex trifoli* L) menunjukkan bahwa tidak adanya endapan berwarna kuning sehingga pada ekstrak daun legundi (*vitex trifoli* L) tersebut bebas mengandung etanol 96%. Pengujian ini bertujuan untuk memastikan tidak mengandung etanol.

f. Uji Skrining Fitokimia

Tabel 2. Hasil Uji Skrining Fitokimia

Skrining Fitokimia	Reagen	Hasil	Keterangan
Flavonoid	<i>Larutan uji</i>	Hijau hitam	Positif (+)
Tanin	<i>Ferri Cloride</i> (FeCl)	Hijau kehitaman	Positif (+)
Alkaloid	<i>Dreagendroff</i>	Cokelat kemerahan	Positif (+)

Tujuan dilakukannya uji skrining fitokimia yaitu untuk mengetahui apakah senyawa tanin ada didalam daun legundi (*vitex trifoli* L). Hasil uji skrining fitokimia diatas menunjukkan bahwa kandungan senyawa pada daun legundi (*vitex trifoli* L) yaitu terdapat senyawa tanin.

Pada pengujian senyawa tanin dilakukan dengan cara ekstrak daun legundi (*vitex trifoli* L) dimasukkan kedalam tabung reaksi sebanyak 1 ml ditambah 4 tetes larutan Ferri Cloride(FeCl) kemudian dikocok. Menurut (Kurnianingsih dkk, 2020) ekstrak tanaman dinyatakan positif senyawa tanin apabila terjadi perubahan warna hijau kehitaman. Pengujian menunjukkan bahwa daun legundi (*vitex trifoli* L) positif mengandung senyawa tanin karena terjadi perubahan warna menjadi hijau kehitaman.

g. Pembuatan Media

Pembuatan media dilakukan dengan cara menimbang Nutrient Agar (NA) sebanyak 3,5 gram, kemudian dimasukkan kedalam erlenmayer dan ditambahkan aquadest sampai 200 ml, dikocok agar larutan homogen. Tutup erlenmayer dengan kapas dan ditambahkan kertas *Alluminium Foil* agar tidak terkontaminasi dan dipanaskan menggunakan hotplate stirrer. Sesekali diaduk agar larutan tetap homogen. Dididihkan selama 5 menit dengan suhu 100°C hingga larutan mendidih. Setelah mendidih larutan media didinginkan selama beberapa menit kemudian cawan petri dan media disterilkan didalam autoclave pada suhu 121°C selama 2 jam. Sebelum cawan petri disterilkan hendaknya dibungkus menggunakan kertas dan ditaruh kedalam plastik yang tahan panas kemudian dimasukkan kedalam *Autoclave*. Setelah disterilkan media dituangkan kedalam cawan petri yang sudah disterilkan, proses ini dilakukan di *Laminar Air Flow* (LAF) dengan cara pertama melakukan penyemprotan alkohol 70% ke meja kerja serta semprot ketangan dan nyalakan api bunsen dan panaskan bibir erlenmeyer agar tidak terkontaminasi dengan mikroorganisme lain selanjutnya dituang ke cawan petri yang sudah disterilkan kemudian didiamkan sampai media memadat.

h. Pemiakan Bakteri

Pemiakan bakteri dilakukan dengan cara menyiapkan Nutrient Agar (NA) yang sudah memadat dan stok bakteri *E.coli* diambil menggunakan jarum ose steril. Sebelum dilakukan pemiakan bakteri yang dikerjakan di *Laminar Air Flow* (LAF) sebaiknya menyemprotkan alkohol 70% kemeja kerja dan ke tangan agar tidak terkontaminasi dengan mikroorganisme lain. Kemudian nyalakan api bunsen dan panaskan jarum ose

yang bertujuan untuk mematikan mikroorganisme lain yang tidak diinginkan. Setelah dipanaskan masukkan kedalam tabung reaksi yang sudah berisi aquadest agar jarum ose tidak terlalu panas saat mengambil bakteri. Kemudian ambil bakteri *E.coli* sebanyak 1 ose dengan cara digores. Selanjutnya goreskan pada Nutrient Agar (NA) yang sudah memadat dengan cara digores zig-zag, setelah itu diinkubasi menggunakan inkubator selama 1x24 jam dengan suhu 37°C. Tujuan diinkubasi menggunakan inkubator agar menumbuhkan mikroorganisme, dibutuhkan waktu selama 24 jam karena pada waktu tersebut bakteri sudah berada pada fase logaritmik (penyesuaian bakteri dengan lingkungannya yang baru), pada fase tersebut bakteri melakukan pembelahan secara konstan dan jumlah sel meningkat. Pada suhu 37°C yang digunakan karena bakteri akan tumbuh dengan baik pada suhu tersebut (Kurniawati dkk, 2019).

i. Suspensi Bakteri

Suspensi bakteri dilakukan di *Laminar Air Flow* (LAF) dengan cara menyiapkan bakteri uji yang sudah diremajakan pada media Nutrient Agar (NA) dan tabung reaksi yang diisi dengan larutan *Natrium Klorida* (NaCl) 0,9% sebanyak 9 ml. kemudian panaskan ose ke api bunsen dan ambil bakteri sebanyak 1 ose kemudian masukkan kedalam larutan *Natrium Klorida* (NaCl) dengan cara tabung reaksi dimiringkan, setelah bakteri terlepas dari ose tutup dengan aluminium foil dan di homogenkan dengan alat *vortex* agar bakteri *E.coli* dan larutan *Natrium Klorida* (NaCl) 0,9% tercampur hingga homogen (Kurama dkk, 2020). Kemudian diinkubasi dalam inkubator selama 1x24 jam pada suhu 37°C. Diinkubasi dengan waktu 24 jam dan suhu 37°C merupakan proses memelihara kultur mikroba yang bertujuan untuk memantau pertumbuhan bakteri (Kurniawati dkk, 2019).

j. Larutan Standar McFarland

Larutan McFarland digunakan sebagai pembanding kekeruhan biakan bakteri dalam medium cair (Aviany dan Pujiyanto, 2020). Dilihat hasil perbandingan larutan standar McFarland dengan *E.coli* yang dikultur dalam media cair tersebut menghasilkan sesuai standar larutan McFarland sehingga dapat melakukan pengujian aktivitas antibakteri agar dapat melihat hasil zona hambat pada ekstrak daun legundi (*vitex trifoli* L).

k. Uji Aktivitas Antibakteri

Pada penelitian uji aktivitas ini menggunakan metode difusi sumuran (lubang). Yang dikerjakan pada meja *Laminar Air Flow* (LAF) dilakukan dengan cara menyiapkan alat dan bahan yang diperlukan dari cawan petri yang sudah berisi Nutrient Agar (NA) yang sudah padat dan sudah disterilkan pada *autoklaf*. Setelah itu suspensi bakteri yang diambil dalam tabung reaksi dengan menggunakan alat *cotton bud* steril kemudian digoreskan di media Nutrient Agar (NA) secara menyeluruh atau merata pada permukaan media dilakukan berulang-ulang.

Media padat Nutrient Agar (NA) yang sudah di tanami bakteri dibuat lubang sumuran sebanyak 4 lubang sumuran pada masing-masing cawan petri dengan diameter 6 mm, kemudian diisi dengan ekstrak daun legundi (*vitex trifoli* L) dengan masing-masing konsentrasi diantaranya (10%, 20%, 30%, 40%, 50% dan 60%) ke dalam lubang sumuran dengan masing-masing sebanyak 100 mikron liter dengan menggunakan mikropipet. Dalam penelitian ini menggunakan kontrol positif Ampisilin dan aquadest sebagai kontrol negatif. Kemudian diinkubasi selama 1x24 jam pada suhu 37°C, selanjutnya diukur zona hambatan dengan menggunakan penggaris.

Dengan hasil Rata-rata sebagai berikut:

Tabel 3. Zona Hambat *E.coli*

No	Konsentrasi	Ampisilin (+)	Ekstrak	Aquadest (-)
1.	10%	25 mm	0 mm	0 mm
2.	20%	30,5 mm	27 mm	0 mm

3.	30%	35 mm	29 mm	0 mm
4.	40%	40 mm	31 mm	0 mm
5.	50%	43 mm	32 mm	0 mm
6.	60%	45 mm	34 mm	0 mm

Berdasarkan hasil tabel diatas setiap perlakuan memiliki perbedaan diameter zona hambat pada setiap konsentrasi. Pada kontrol negatif (Aquadest) dan konsentrasi 10% memiliki diameter zona hambat 0 mm, pada control positif (ampisilin) dan ekstrak dengan konsentrasi 10%, memiliki diameter zona hambat 25 mm dan 0 mm dengan kategori lemah. Konsentrasi 20% memiliki diameter zona hambat 30,5 mm (ampisilin) dan 27 mm (ekstrak) dengan kategori kuat. Konsentrasi 30% memiliki diameter zona hambat 35 mm (ampisilin) dan 29 mm (ekstrak) dengan kategori kuat. Konsentrasi 40% memiliki zona hambat 40 mm (ampisilin) dan 31 mm (ekstrak) dengan kategori kuat. Konsentrasi 50% memiliki diameter zona hambat 43 mm (ampisilin) dan 32 mm (ekstrak) dengan kategori kuat. Konsentrasi 60% memiliki zona hambat 45 mm (ampisilin) dan 34 mm (ekstrak) dengan kategori sangat kuat. Aktivitas antibakteri menggunakan ampisilin masih lebih tinggi jika dibandingkan dengan aktivitas antibakteri menggunakan ekstrak etanol daun legundi (*vitex trifoli* L) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E.coli* karena rata-rata zona hambat pada perlakuan kontrol positif masih lebih tinggi dan berbeda jika dibandingkan dengan rata-rata zona hambat pada perlakuan ekstrak daun legundi (*vitex trifoli* L). Maka dari itu semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun legundi (*vitex trifoli* L) maka semakin panjang diameter zona hambat terhadap bakteri *E.coli*.

Adapun kekuatan daya hambat antibakteri dengan diameter zona hambat dapat dikelompokkan menjadi 4 kelompok (Lestari ddk, 2016) yakni:

Tabel 4. Kategori Diameter Zona Hambat.

No	Kategori	Diameter Zona Hambat Ampisilin dan ekstrak
1	Lemah	Zona hambat \leq 25 mm dan 0
2	Sedang	Zona hambat 30,5 mm dan 27 mm
3	Kuat	Zona hambat 35 mm- 43 mm dan 29 mm – 32 mm
4	Sangat Kuat	Zona hambat \geq 43 mm dan 32

9. Penimbangan sampel basah

Penimbangan dilakukan setelah proses pengambilan sampel. Hal ini dilakukan untuk mengetahui berat sampel yang akan digunakan pada proses pengeringan dan proses maserasi. Sampel yang terlalu sedikit dapat mengakibatkan proses lainnya tidak dapat dilakukan. Oleh karena itu, penimbangan perlu dilakukan untuk mengetahui jumlah bahan yang digunakan. Hasil Penimbangan basah daun legundi sebanyak 2 Kg.

10. Pencucian

Setelah proses penimbangan dilakukan, selanjutnya masuk ke tahap pencucian. Sampel daun legundi dicuci untuk membersihkan daun dari kotoran ataupun benda asing yang menempel pada daun legundi. Pencucian dilakukan pada air yang mengalir dan bersih. Tujuannya agar kotoran atau benda asing tidak menempel atau melekat kembali pada sampel.

11. Pengeringan pada suhu ruangan selama 10 hari

Pengeringan sampel daun legundi dilakukan dengan cara diangin – anginkan pada suhu ruangan kurang lebih 25°C. pengeringan dilakukan selama 10 hari untuk mendapatkan hasil sampel kering yang maksimal.

12. Penimbangan sampel kering



Sampel yang telah kering selanjutnya ditimbang. Hasil timbangan sampel basah dengan kering akan berbeda. Hal ini dikarenakan pada sampel basah masih terdapat kadar air yang banyak sedangkan, pada sampel kering kadar air kurang lebih sebanyak 10%. Hasil timbangan sampel kering sebanyak 1 Kg.

13. Penghalusan menggunakan belender



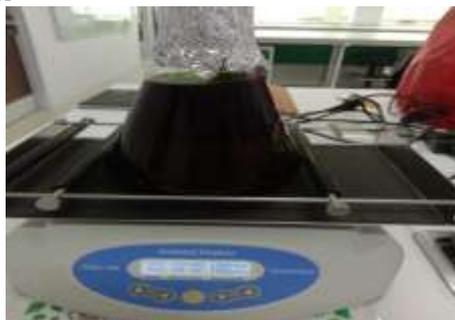
Sampel yang sudah kering dan ditimbang. Selanjutnya di haluskan dengan blender/ digerus. Hal ini dilakukan untuk mempermudah dalam proses maserasi dan mendapatkan hasil maserasi yang maksimal.

14. Pengayakan



Pengayakan dilakukan untuk memisahkan sampel yang berukuran besar dan kecil. Hal ini dilakukan untuk mempermudah proses maserasi dan proses penyaringn. Sampel yang ukuran kecil atau halus mendapatkan hasil yang lebih baik dibandingkan dengan sampel yang berukuran besar atau kasar.

15. Tahap maserasi



Setelah proses pengayakan selanjutnya masuk ke proses maserasi. Pertama – tama timbanglah sampel daun legundi sebanyak 149 Gr. Pindahkan ke wadah/toples kaca. Lalu masukkan bahan pelarut etanol 96% sampai melebihi batas sampel. Tempatkan wadah yang berisi sampel ke alat maserasi (orbital shaker), kemudian didiamkan selama 3 hari.

16. Penyaringan



Setelah melalui proses maserasi, sampel disaring menggunakan kertas saring. Penyaringan dilakukan untuk mendapatkan ekstrak cair pada sampel. Ekstarak cair daun legundi yang telah disaring sebanyak 500ml.

17. Tahap evaporasi

Evaporasi atau pemanasan merupakan tahapan untuk mendapatkan ekstrak kental dari sampel daun legundi. Evaporasi pada sampel dilakukan dengan suhu kurang lebih 45°C - 25°C dengan menggunakan alat rotavapor. Proses evaporasi

18. Tahap freeze dry

Freeze dry adalah tahapan untuk memperoleh tekstur ekstrak yang agak kering. Setelah proses evaporasi ekstrak memiliki tekstur cair, hal ini berpengaruh pada proses pengujian fitokimia pada sampel. Sampel yang cair akan mendapatkan hasil yang kurang baik ()

19. Uji fitokimia

Uji fitokimia merupakan tahapan untuk mendapatkan perubahan pada sampel berupa warna, endapan. Uji fitokimia tahapan untuk mengetahui ada dan tidaknya kandungan kimia yang kita ujikan. Untuk pengujian fitokimia harus menggunakan beberapa reagen sesuai dengan kandungan kimia yang diujikan.

Nama senyawa	Hasil	Foto
Alkaloid : tes dragendroff	Warnanya coklat kemerahan (positif).	
Alkaloid : tes mayer	Warnanya Cokelat (negative).	
Alkaloid : tes wagner	Warnanya hijau tua (positif).	
Tannin : uji ferri clorida	Menghasilkan warna hijau gelap (positif) atau fenolik.	

Flavonoid : untuk larutan uji	Warnanya hijau hitam	
Saponin	Warnanya coklat pekat (negative)	

20. Tahap auto clave

Tahap auto clave adalah tahap untuk mensterilkan alat dan bahan. Media natrium agar ditimbang sebanyak 2,598 gr dan ukur natrium klorida sebanyak 20 ml, dimasukkan ke erlen mayer lalu larutkan dengan aquadest sebanyak 125 ml, kemudian ditutup dengan aluminium foil. alat – alat yang digunakan, 8 cawan petri dibungkus dengan kertas KPS, tabung reaksi 2 buah, aquadest dimasukkan kedalam erlen mayer lalu ditutup dengan aluminium foil, alat ukur ditutup dengan aluminium foil. Alat – alat tersebut dimasukkan ke keranjang auto clave. Kemudian media natrium agar dan natrium klorida yang telah dilarutkan dan ditutup aluminium foil dimasukkan kedalam alat auto clave / alat pensterilisasi bersamaan dengan alat – alat yang distrelisasi. Proses sterilisasi dilakukan pada suhu 121°C selama 15 menit. kemudian dikeluarkan, natrium agar dipanaskan sampai benar – benar bening pada suhu 100°C – 192°C. media natrium agar diturunkan dari alat pemanasan, lalu ditunggu beberapa menit agar tingkat suhu panasnya berkurang. Setelah itu tutup pakek aluminium foil dan langsung bawa ke alat seterilisasi lalu siapkan cawan petri dan tuang natrium agar yang udah di panaskan ke dalam cawan petri sedikit demi sedikit dan tunggu sampai bentuk cairan berubah menjadi bentuk padatan lalu bungkus dengan plastic sampe rapat setelah itu simpan didalam kulkas.



21. Uji antibakteri

Uji antibakteri merupakan uji yang dilakukan untuk mengetahui tingkat keaktivitasan bakteri *e. coli* terhadap obat yang telah beredar dengan ekstrak dari tanaman yang diteliti. Dari hasil penelitian dengan menggunakan konsentrasi yang berbeda ampisilin dan ekstrak daun legundi yakni; 10%, 20%, 30%, 40%, 50% dan 60%.

Konsentrasi setiap ampisilin dan ekstrak daun legundi diberikan pada natrium agar yang telah di sebarakan bakteri *E.coli*. pada natrium agar dibuatkan sumuran, kemudian konsentrasi dari ampisilin dan ekstrak daun legundi di dimasukkan. Kemudian diinkubasi selama 1 x 24 jam, lalu diamati dan diukur batas

penyebaran sampel. Berikut data hasil penelitian berdasarkan konsentrasi yang berbeda:

No	Konsentrasi	Ampisilin	Ekstrak	Hasil
1.	10%	25 mm	0 mm	
2.	20%	30,5 mm	27 mm	
3.	30%	35 mm	29 mm	
4.	40%	40 mm	31 mm	
5.	50%	43 mm	32 mm	
6.	60%	45 mm	34 mm	

D. KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa vitex trifoli L memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *E.coli*, dimana variasi konsentrasi ekstrak daun legundi (vitex trifoli L) memiliki pengaruh daya hambat terhadap bakteri *E.coli*. Semakin besar konsentrasi maka semakin tinggi daya hambat terhadap bakteri *E.coli*. Adapun besar daya hambat masing-masing konsentrasi. Pada konsentrasi 10% memiliki diameter zona hambat 0 mm dengan kategori lemah. Konsentrasi 20% memiliki diameter

zona hambat 27 mm dengan kategori kuat. Konsentrasi 30% memiliki diameter zona hambat 29 mm dengan kategori kuat. Konsentrasi 40% memiliki diameter zona hambat 31 mm dengan kategori kuat. Konsentrasi 50% memiliki konsentrasi 32 mm dengan kategori kuat. Konsentrasi 60% memiliki diameter zona hambat 34 mm dengan kategori kuat.

Berdasarkan dari hasil penelitian ini, maka dapat disarankan hal-hal sebagai berikut untuk penelitian selanjutnya:

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengembangkan daun legundi (*Vitex trifoli* L) sebagai antibakteri terhadap bakteri lainnya dan menggunakan konsentrasi lebih tinggi.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengembangkan daun legundi (*Vitex trifoli* L) sebagai sediaan formulasi dan sediaan farmasi.
3. Perlu dilakukan penelitian secara *in vivo*.

DAFTAR PUSTAKA

- Bakri Z., Moch Hatta., Nasrum M., 2015, Deteksi Keberadaan Bakteri *Escherichia coli* O157:H7 pada Feses Penderita Diare dengan Metode Kultur dan PCR, JST Kesehatan, April 2015, 5(2) : 184 – 192.
- Baskaranatha, Putu, Bagus O., Sudarmaja, I, Made., Swastika, I, Kadek. 2020. Efektivitas ekstrak etanol daun legundi (*Vitex trifoli* L.) Sebagai larvisida pada larva *Aedes aegypti*. Jurnal Medika Udayana. Vol.2, No.6.
- Dwinatari, Indrawan, Kurnia., Murti, Yosi, Bayu. 2015. Pengaruh waktu pemanenan dan tingkat maturasi daun terhadap kadar viteksikarpin dalam daun legundi (*Vitekx trifoli* L.). Vol.20 (2), p 105-111. Traditional Medicine Journal.
- Geetha, V., A. Doss, dan P. A. Doss. 2004. Antimicrobial Potential Of *Vitex Trifolia* Linn. Ancient Science of Life, 23(4), 30–32. Journal Pubmed. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22557139>. Diakses pada 21 Oktober 2019.
- Irawan, Alfa Yosi, 2013. Hubungan antara Aspek Kesehatan Lingkungan dalam PHBS Rumah Tangga dengan Kejadian Penyakit Diare di Kecamatan Karangreja Tahun 2012. Unnes Journal of Public Health. <http://journal.unnes.ac.id/sju/index.php/ujph/article/view/3537/317> Diakses : 8 Agustus 2014
- Khotimah, Husnul. 2019. Aktivitas antibakteri ekstrak etanol 70% daun legundi (*Vitex trifoli* L.) Terhadap pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi*. Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim. Malang.
- Natheer, S. E., Sekar, C., Amutharaj, P., Rahman, M. S. A., & Khan, K. F. (2012). Evaluation of antibacterial activity of *Morinda citrifolia*, *Vitex trifolia* and *Chromolaena odorata*. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 6(11), 783–788. <https://doi.org/10.5897/AJPP11.435>
- Nurpiah. 2020. Identifikasi dan uji aktivitas ekstrak etanol daun asam jawa (*Tamarindus indica* L.) terhadap bakteri *Escherichia coli*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Nahdlatul Wathan Mataram.
- Permana, Derry., Emelia, Rida. 2022. Analisis penggunaan obat rasional pengobatan diare non spesifik di apotek kimia farma 167 Cimahi. Jurnal social dan sains. Vol.2, No.1. Politeknik Piksi Ganesha Bandung.
- PHBS rumah tangga dengan kejadian penyakit diare di Kecamatan Karangreja tahun 2012. Unnes Journal of Public Health. UJPH 2 (4). Universitas Negeri Semarang. Indonesia.
- Yuana, Derryl, Agustin. 2016. Gambaran penggunaan antibiotic dengan resep dan tanpa resep dokter di beberapa apotek di area Jember Kota. Fakultas Farmasi. Universitas Jember.