

## **Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Stevia (*Stevia rebaudiana*) terhadap Bakteri Uji Penyebab Infeksi Saluran Pencernaan secara Klt-Bioautografi**

### ***Antibacterial Activity of Ethanol Extract of Stevia Leaves (*Stevia rebaudiana*) Against Test Bacteria Causing Digestive Tract Infections by TLC-Bioautography***

**Rusli<sup>1</sup>, A Hasrawati<sup>2\*</sup>, Dwi Kurnia Aslam<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Program Studi Sarjana Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Muslim Indonesia; [rusli@umi.ac.id](mailto:rusli@umi.ac.id)

<sup>2</sup> \*Program Studi Sarjana Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Muslim Indonesia; [a.hasrawati@umi.ac.id](mailto:a.hasrawati@umi.ac.id),

<sup>3</sup> Program Studi Sarjana Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Muslim Indonesia; [dwikurniaaslam@gmail.com](mailto:dwikurniaaslam@gmail.com)

\*[a.hasrawati@umi.ac.id](mailto:a.hasrawati@umi.ac.id)

#### **ABSTRACT**

*Stevia leaves (*Stevia rebaudiana*) are one of the sugar substitute plants in Indonesia that contain steviol glycosides. This study aims to determine the antibacterial activity of ethanol extract of stevia leaves (*Stevia rebaudiana*) against test bacteria that cause digestive tract infections using the TLC-Bioautography method. This research method was carried out experimentally to test the antibacterial activity of stevia leaves using TLC-Bioautography. The results of this study showed that ethanol extract of stevia leaves can inhibit the growth of test bacteria *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. The bioautogram profile of antibacterial activity of ethanol extract of stevia leaves (*Stevia rebaudiana*) using TLC- on the test bacteria *Shigella dysenteriae* obtained 2 active spots with Rf values of 0.88 and 0.27. In *Salmonella typhi* bacteria, 3 active spots were obtained with Rf values of 0.88; 0.57 and 0.27. In *Escherichia coli* bacteria, 3 active spots were obtained with Rf values of 0.88; 0.57 and 0.27. In *Vibrio cholerae* bacteria, 3 active spots were obtained with Rf values of 0.88; 0.57 and 0.27. It can be concluded that stevia leaves (*Stevia rebaudiana*) have antibacterial activity. It is recommended to confirm the antibacterial activity of ethanol extract of stevia leaves (*Stevia rebaudiana*) against bacteria of several different infectious disorders.*

**Keywords :** *Antibacterial, Stevia rebaudiana, Stevia Leaf, TLC-Bioautography*

#### **ABSTRAK**

Daun stevia (*Stevia rebaudiana*) merupakan salah satu tanaman pengganti gula di Indonesia yang mengandung steviol glikosida. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun stevia (*Stevia rebaudiana*) terhadap bakteri uji penyebab infeksi saluran pencernaan dengan metode KLT-Bioautografi. Metode penelitian ini dilakukan secara eksperimental untuk menguji aktivitas antibakteri daun stevia dengan KLT-Bioautografi. Hasil pada penelitian ini, ekstrak etanol daun stevia dapat menghambat pertumbuhan bakteri uji *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Escherichia coli* dan *Vibrio cholerae*. Profil bioautogram aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun stevia (*Stevia rebaudiana*) secara KLT- pada bakteri uji *Shigella dysenteriae* diperoleh 2 bercak aktif dengan nilai Rf 0,88 dan 0,27. Pada bakteri *Salmonella typhi* diperoleh 3 bercak aktif dengan nilai Rf 0,88; 0,57 dan 0,27. Pada bakteri *Escherichia coli* diperoleh 3 bercak aktif dengan nilai Rf 0,88; 0,57 dan 0,27. Pada bakteri *Vibrio cholerae* diperoleh 3 bercak aktif dengan nilai Rf 0,88; 0,57 dan 0,27. Dapat disimpulkan bahwa daun stevia (*Stevia rebaudiana*) memiliki aktivitas sebagai antibakteri. Disarankan untuk memastikan aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun stevia (*Stevia rebaudiana*) terhadap bakteri dari beberapa gangguan infeksi berbeda

**Kata Kunci :** *Antibakteri, Stevia rebaudiana, Daun Stevia, KLT-Bioautografi*

#### **PENDAHULUAN**

Infeksi merupakan salah satu masalah utama kesehatan di Indonesia. Infeksi adalah masuknya mikroorganisme patogen dan bereplikasi di dalam jaringan inang sehingga mengganggu fungsi normal dari inang serta memperlama respon inflamasi atau peradangan misalnya munculnya luka kronik, gangrene dan kehilangan organ tubuh bahkan kematian<sup>1-3</sup>. Infeksi adalah proses invasif oleh mikroorganisme dan



berpoliferasi di dalam jaringan maupun cairan tubuh yang menimbulkan gejala klinis baik lokal maupun sistemik. Dalam kamus keperawatan menyebutkan bahwa infeksi ialah invasi dan multiplikasi mikroorganisme dalam jaringan tubuh, khususnya yang menimbulkan cedera seluler setempat akibat metabolisme kompetitif, toksin, replikasi intraseluler atau reaksi antigen-antibodi<sup>4</sup>

Infeksi saluran pencernaan sangat umum terjadi. Diare adalah penyebab kematian paling umum di negara berkembang. Patogen yang menyebabkan diare dapat ditularkan ke manusia dalam tiga cara: melalui makanan, air, atau penularan dari orang ke orang. Banyak dari infeksi ini sembuh spontan dan tidak memerlukan pengobatan. Beberapa dapat menyebar ke bagian lain di tubuh dan memerlukan perawatan untuk mencegah kerusakan lebih lanjut. Kuncinya adalah mengetahui kapan harus merawat dan bagaimana mengobati pasien<sup>5</sup>

Salah satu obat andalan untuk mengatasi masalah tersebut adalah antibiotik. Antibiotik merupakan obat yang paling banyak digunakan pada infeksi yang disebabkan oleh bakteri<sup>6,7</sup>. Antibiotik adalah zat atau senyawa kimia yang memiliki kemampuan dalam menghambat pertumbuhan dan bahkan untuk mematikan bakteri dan mikroorganisme lainnya. Antibiotik umumnya dikenal dengan antibakteri, namun antibiotik pada dasarnya diklasifikasikan menjadi antibakteri, antijamur, tergantung mikroorganisme yang mereka lawan<sup>8,9</sup>

Namun, penggunaan yang berlebihan dan tidak sesuai akan antibiotik, menyebabkan kemunculan bertahap populasi bakteri yang resisten terhadap antibiotik dan hal inilah yang menjadi permasalahan kesehatan masyarakat global. Resistensi antibiotik terjadi karena proses seleksi alam. Penggunaan antibiotik untuk melawan infeksi memaksa bakteri beradaptasi atau mati secara tidak bergantung dengan dosis atau rentang waktu. Bakteri yang bertahan membawa gen resistensi obat, yang kemudian ditransfer, baik ke dalam sesama spesiesnya maupun pada spesies lain yang tidak terkait<sup>10</sup>

Peningkatan kasus resistensi antibiotik bakteri tidak diimbangi dengan penemuan antibiotik baru. Berbagai upaya telah dilakukan untuk mengurangi kejadian resistensi antibiotik diantaranya mengontrol penggunaan antibiotik, mengembangkan penelitian untuk lebih mengerti tentang mekanisme resistensi secara genetik, dan penemuan obat baru baik sintetik maupun yang berasal dari bahan alam. Upaya pencarian bahan baku obat dari bahan alam sampai saat ini masih terus dilakukan salah satunya sebagai antibiotik<sup>11</sup>

Berbagai penelitian telah mengungkap aktivitas antibiotik berbagai senyawa yang dapat menjadi sumber agen antibiotik baru, seperti ekstrak berbagai jenis tumbuhan tradisional<sup>12</sup>. Terkait dengan pembahasan diatas, penyakit infeksi saluran pencernaan juga pasti memiliki obat yang memiliki potensi sebagai penyembuhan penyakit infeksi tersebut. Salah satunya seperti tanaman stevia yang akan kami ujikan dalam penelitian kami. konsentrasi tertinggi dari ekstrak stevia dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Pernyataan dari jurnal lain yang diperoleh yaitu daun stevia sangat kaya akan senyawa terpenoid dan flavonoidnya sehingga memiliki keefektifan untuk digunakan sebagai obat antibakteri<sup>13</sup>.

Berdasarkan latar belakang yang dipaparkan sebelumnya, bahwa stevia memiliki kandungan senyawa yang berpotensi sebagai antibakteri yang dapat mengobati infeksi saluran pencernaan, maka dari itu peneliti akan melakukan pengujian senyawa pada daun stevia sebagai antibakteri dengan metode Kromatografi Lapis Tipis Bioautografi. Metode ini dipilih karena dapat secara efektif memisahkan senyawa aktif yang berpotensi sebagai antibakteri. Hasil pengujian diharapkan dapat memberikan informasi yang berguna dalam pengembangan obat-obatan baru untuk mengobati infeksi saluran pencernaan. Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun stevia (*Stevia rebaudiana*) terhadap bakteri penyebab infeksi saluran pencernaan secara KLT-Bioautografi.

## METODE

Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret 2024 sampai selesai. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Farmasi Universitas Muslim Indonesia Makassar. Populasi yang digunakan pada penelitian ini yaitu tanaman stevia (*Stevia rebaudiana*). Sampel yang digunakan dalam

penelitian ini yaitu daun stevia (*Stevia rebaudiana*) yang diperoleh dari Kecamatan Cinambo, Kota Bandung, Jawa Barat.

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian secara eksperimental di laboratorium dengan melihat aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun stevia (*Stevia rebaudiana*) dengan menggunakan metode KLT-Bioautografi. Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah autoklaf (Smic® Model YX-280 B), cawan Petri (Normax®), gelas erlenmeyer (Iwaki Pyrex) gelas kimia 250 mL dan 500 mL (Iwaki Pyrex), inkubator (Memert), Laminar Air Flow (LAF), lampu spiritus, mikropipet (Huwai), Lampu UV 254 nm dan 366 nm, lempeng KLT G60 F254 (E.Merck), oven (Memmert®), ose bulat, penangas air, spektrofotometer, tabung reaksi, timbangan analitik (Chyco®), dan wadah maserasi.

Bahan yang digunakan yaitu aquadest, biakan murni *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, lempeng KLT, Etanol 96%, medium Natrium Agar (NA), ekstrak etanol daun stevia, Aluminium klorida ( $AlCl_3$ ), Dragendorff, Anisaldehyd asam sulfat, Vanilin asam sulfat, dan Besi (III) klorida (Fitriana, 2021). Sampel daun stevia (*Stevia Rebaudiana*) didapatkan dari Kecamatan Cinambo, Kota Bandung, Jawa Barat. Selanjutnya sampel dikumpulkan dan dilakukan sortasi basah, dibersihkan dengan air mengalir, dirajang, dan dikeringkan dibawah sinar matahari secara tidak langsung, setelah itu dilakukan sortasi kering. Kemudian sampel diserbukkan dan diperoleh serbuk simplisia kering<sup>14</sup>.

Daun stevia sebanyak 1 kg dibersihkan, kemudian dikeringkan dan diangin-anginkan pada suhu kamar, kemudian dibuat menjadi serbuk dengan alat penyerbuk dilanjutkan dengan proses maserasi dengan direndam dalam etanol 96% menggunakan botol tertutup minimal selama 3 hari. Hasil maserasi disaring dengan corong Buchner sehingga didapatkan filtrat dan residu kemudian filtrat dipekatkan menggunakan alat rotary evaporator pada suhu tidak lebih dari 50°C, sehingga pelarut etanol terpisah dengan ekstrak tumbuhan dan didapatkan ekstrak kental. Hasil akhir berupa ekstrak kental daun stevia dengan konsentrasi 100%. Ekstrak kental yang diperoleh kemudian dimasukkan kedalam botol steril<sup>15</sup>

Alat-alat gelas disterilisasi dengan panas kering (udara kering) pada oven. Sterilisasi dilakukan pada temperatur 170°C selama  $\pm 1$  jam. Jarum ose disterilkan dalam nyala api bunsen sampai merah membara. Media yang digunakan disterilkan dengan sterilisasi basah (uap air panas bertekanan) yaitu dengan menggunakan autoklaf. Sterilisasi ini dilakukan selama 15 menit dengan suhu 121°C dan tekanan 2 atm. Peremajaan kultur murni bakteri uji. Mikroba diambil dari biakan masing-masing 1 ose kemudian diinokulasi pada medium NA miring. Masing-masing mikroba diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C pada bakteri. Setelah itu dapat digunakan sebagai mikroba uji.

Mikroba uji hasil peremajaan, masing-masing disuspensikan dengan larutan NaCl fisiologis 0,9% dan dimasukkan kedalam kuvet, kemudian diukur transmitannya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 580 nm pada 25% untuk bakteri. Sebagai blanko digunakan NaCl fisiologis 0,9% steril. Sampel ekstrak etanol daun stevia ditimbang sebanyak 10 mg dimasukkan ke dalam vial lalu ditambahkan Dimethyl Sulfoxide (DMSO) sebanyak 0,2 mL kemudian dilarutkan. Setelah larut ditambahkan medium Nutrient Agar (NA) sebanyak 9,8 mL sehingga diperoleh konsentrasi 5 mg/mL. Kemudian campuran tersebut dituang ke dalam cawan petri lalu dihomogenkan dan biarkan memadat. Bakteri yang telah disuspensikan masing-masing diambil 1 ose dan digoreskan di atas medium. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 1x24 jam, setelah itu diamati aktivitas antibakterinya yang di tandai dengan ada atau tidak adanya pertumbuhan bakteri.

Ekstrak sampel yang menunjukkan zona hambatan dipisahkan secara KLT menggunakan plat KLT teraktivasi dengan cara dipanaskan dalam oven pada suhu 110°C dengan waktu  $\pm 30$  menit sebelum digunakan. Sampel ditotolkan pada plat yang berukuran 6x1 cm dan dielusi dalam ruang jenuh dengan eluen dari atas plat hingga batas 0,5 cm. Keluarkan plat dari chamber dan angin-anginkan sampai eluen menguap. Selanjutnya, pengamatan dilakukan di bawah sinar UV 254 nm dan UV 366 nm, plat yang telah dielusi disemprot dengan penampak bercak. Kemudian hitung nilai Retardation factor (Rf).

Pengujian Secara KLT-Bioautografi Hasil identifikasi secara KLT dengan eluen dilanjutkan dengan uji KLT-Bioautografi dengan cara medium NA (Nutrient agar) sebanyak 10 ml dituangkan ke dalam cawan petri secara aseptis lalu biarkan sampai media memadat, selanjutnya ditambahkan bakteri uji sebanyak 20 µL, lalu dihomogenkan. Kemudian lempeng KLT yang telah dielusi diletakkan diatas permukaan medium NA yang memadat. Lalu diamkan selama 30 menit, kemudian lempeng (kromatogram) diangkat dan dikeluarkan dari medium. Kemudian dilakukan inkubasi selama 1x24 jam pada suhu 37<sup>0</sup>C lalu diamati zona hambatan tertentu.

## HASIL

Pada penelitian ini, peneliti akan menguji aktivitas antibakteri terhadap bakteri penyebab infeksi saluran pencernaan. Pengambilan sampel dilakukan dengan cara dipesan dari Kota Bandung, Jawa Barat. Sampel yang dipesan sudah di cuci dan dikeringkan serta dihaluskan dan dibungkus dalam plastik kedap udara. Pertama-tama sampel serbuk dimasukkan kedalam toples kaca untuk di maserasi dengan menggunakan larutan etanol 96% 1,5 liter selama 3 hari. Selanjutnya, hasil maserasi disaring dan kemudian dipekatkan dengan alat rotary vaccum evaporator sehingga diperoleh ekstrak etanol daun stevia. Selanjutnya, ekstrak etanol daun stevia di uapkan untuk mendapatkan ekstrak kental daun stevia. Adapun hasil fraksi dapat dilihat pada tabel 1.

**Tabel 1. Hasil Persen Rendamen Ekstrak Etanol Daun Stevia (*Stevia rebaudiana*)**

Jenis Sampel	Berat Simplisia (g)	Volume Pelarut (mL)	Berat Ekstrak (g)	Persen Rendamen (%)
( <i>Stevia rebaudiana</i> )	500 g	1500 mL	54,25 g	10,85%

Pada uji skrining dilakukan untuk menentukan bakteri uji yang dihambat dan dibunuh oleh ekstrak etanol daun stevia. Sampel daun seroh dilarutkan dengan pelarut dimetil sulfoksida (DMSO) 1%, alasan penggunaan DMSO 1% yaitu untuk melarutkan sampel ekstrak etanol daun stevia. Hasil Uji skrining antibakteri ekstrak etanol daun stevia (*Stevia rebaudiana*) yang didapatkan menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap bakteri uji, dapat dilihat pada tabel 2.

**Tabel 2. Hasil Pengujian Skrining Antibakteri Menggunakan Ekstrak Etanol Daun Stevia (*Stevia rebaudiana*)**

No.	Bakteri Uji			
	SD	ST	EC	VC
1	+	+	+	+

Keterangan :

SD : *Shigella dysenteriae*

ST : *Salmonella typhi*

EC : *Escherichia coli*

VC : *Vibrio cholerae*

++ : membunuh pertumbuhan bakteri uji

+

Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun stevia (*Stevia rebaudiana*) dapat menghambat bakteri *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, dan *Vibrio cholerae* yang ditunjukkan dengan label +. Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun stevia (*Stevia rebaudiana*) dapat menghambat bakteri *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, dan *Vibrio cholerae* yang ditunjukkan dengan label +. Penemuan ini menunjukkan potensi daun stevia sebagai bahan alami dalam pengobatan infeksi bakteri yang disebabkan oleh mikroorganisme patogen. Selain itu, ekstrak etanol daun stevia juga dapat menjadi alternatif pengganti antibiotik kimia yang memiliki efek samping.

Langkah selanjutnya dalam pengujian adalah pemisahan senyawa menggunakan teknik kromatografi lapis tipis (KLT). Metode ini memanfaatkan prinsip adsorpsi dan partisi yang dipengaruhi oleh fase diam

(adsorben) dan fase gerak (eluen). Dalam pengujian KLT, digunakan lempeng KLT berukuran 7 x 1 cm yang telah diaktifkan dengan pemanasan pada suhu 105°C selama 15 menit untuk menghilangkan kandungan air pada lempeng. Lempeng kromatogram hasil elusi senyawa uji diletakkan di atas medium agar NA yang telah diinokulasi dengan bakteri uji. Setelah diinkubasi selama 1 jam, terjadi proses difusi antara lempeng dan cawan petri, menghasilkan zona bening di sekitar lempeng. Zona bening ini menunjukkan adanya aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun stevia (*Stevia rebaudiana*) terhadap bakteri uji. Hasil pengujian aktivitas antibakteri ini dapat dilihat pada Tabel 3.

**Tabel 3. Hasil Pengujian Aktivitas Antibakteri dari Ekstrak Etanol Daun Stevia (*Stevia rebaudiana*) secara KLT-Bioautografi dengan Eluen Kloroform : Etanol : Air (15 : 6 : 1).**

No	Kode Bakteri Uji	Bercak	Nilai RF		
			1	2	3
1	SD	2	0,88	0,27	
2	ST	3	0,88	0,57	0,27
3	EC	2	0,88	0,57	0,27
4	VC	3	0,88	0,57	0,27

Keterangan :

- SD : *Shigella dysenteriae*  
ST : *Salmonella typhi*  
EC : *Escherichia coli*  
VC : *Vibrio cholerae*

Adapun hasil dari pengujian KLT-Bioautografi pada perbandingan eluen kloroform : etanol : air (15 : 6 : 1). Pada bakteri uji *Shigella dysenteriae* diperoleh 2 bercak aktif dengan nilai Rf 0,88 dan 0,27. Pada bakteri *Salmonella typhi* diperoleh 3 bercak aktif dengan nilai Rf 0,88; 0,57 dan 0,27. Pada bakteri *Escherichia coli* diperoleh 3 bercak aktif dengan nilai Rf 0,88; 0,57 dan 0,27. Pada bakteri *Vibrio cholerae* diperoleh 3 bercak aktif dengan nilai Rf 0,88; 0,57 dan 0,27.

## PEMBAHASAN

Hasil penelitian telah menjawab tujuan penelitian dengan dimana hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun stevia (*Stevia rebaudiana*) dapat menghambat bakteri *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, dan *Vibrio cholerae* yang ditunjukkan dengan label +. Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun stevia (*Stevia rebaudiana*) dapat menghambat bakteri *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, dan *Vibrio cholerae* yang ditunjukkan dengan label +. Penemuan ini menunjukkan potensi daun stevia sebagai bahan alami dalam pengobatan infeksi bakteri yang disebabkan oleh mikroorganisme patogen. Selain itu, ekstrak etanol daun stevia juga dapat menjadi alternatif pengganti antibiotik kimia yang memiliki efek samping.

Infeksi merupakan salah satu masalah utama kesehatan di Indonesia<sup>16</sup>. Infeksi adalah masuknya mikroorganisme patogen dan bereplikasi di dalam jaringan inang sehingga mengganggu fungsi normal dari inang serta menjauhkan respon inflamasi atau peradangan misalnya munculnya luka kronik, gangrene dan kehilangan organ tubuh bahkan kematian<sup>17</sup>. Infeksi saluran pencernaan sangat umum terjadi. Diare adalah penyebab kematian paling umum di negara berkembang<sup>18,19</sup>. Penyakit infeksi saluran pencernaan juga pasti memiliki obat yang memiliki potensi sebagai penyembuhan penyakit infeksi tersebut. Salah satunya seperti tanaman stevia yang akan kami ujikan dalam penelitian kami<sup>18,20-22</sup>. Menurut (Wenda, Wowor, & Leman, 2017) bahwa, konsentrasi tertinggi dari ekstrak stevia dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Pernyataan dari jurnal lain yang diperoleh yaitu daun stevia sangat kaya akan senyawa terpenoid dan flavonoidnya sehingga memiliki keefektifan untuk digunakan sebagai obat antibakteri<sup>13</sup>.

Ekstrak etanol daun stevia (*Stevia rebaudiana*) dapat menghambat pertumbuhan bakteri uji *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Escherichia coli*, dan *Vibrio cholerae*. Profil bioautogram aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun stevia (*Stevia rebaudiana*) secara KLT-Bioautografi pada bakteri uji *Shigella dysenteriae* diperoleh 2 bercak aktif dengan nilai Rf 0,88 dan 0,27. Pada bakteri *Salmonella typhi* diperoleh 3 bercak aktif dengan nilai Rf 0,88; 0,57 dan 0,27. Pada bakteri *Escherichia coli* diperoleh 3 bercak aktif dengan nilai Rf 0,88; 0,57 dan 0,27. Pada bakteri *Vibrio cholerae* diperoleh 3 bercak aktif dengan nilai Rf 0,88; 0,57 dan 0,27. Berdasarkan penelitian yang dilakukan, pengujian tersebut perlu dilanjutkan untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun stevia (*Stevia rebaudiana*) dengan bakteri dari beberapa penyakit infeksi lainnya dan dengan beberapa metode contohnya metode difusi agar.

Proses pembuatan suspensi bakteri uji dimulai dengan pengambilan koloni bakteri yang telah diinokulasi menggunakan kawat ose steril. Koloni bakteri tersebut kemudian disuspensikan dengan hati-hati dalam tabung reaksi yang berisi 2 ml larutan NaCl 0,9%<sup>23</sup>. Kekeruhan suspensi bakteri kemudian disesuaikan dengan standar kekeruhan larutan McFarland. Prosedur ini dilakukan dengan cermat dan teliti untuk setiap jenis bakteri uji guna memastikan keseragaman dan konsistensi dalam proses pengujian.

Selanjutnya, hal yang dilakukan pada penelitian ini, yaitu pengujian skrining aktivitas antibakteri menggunakan empat bakteri uji, yaitu *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Escherichia coli*, dan *Vibrio cholerae*. Sebelum tahap uji skrining dilakukan, hal yang dilakukan terlebih dahulu ialah peremajaan bakteri. Peremajaan bakteri bertujuan untuk mengaktifkan kembali metabolisme bakteri setelah proses penyiapan<sup>24,25</sup>. Prosedur ini dilakukan dengan mengambil satu jarum ose yang berisi biakan murni bakteri dan kemudian menggoreskannya pada media agar dengan permukaan miring. Biakan tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 37 derajat Celcius selama 24 jam. Inkubasi dilakukan dengan tujuan utama untuk mendapatkan biakan murni. Artinya, proses ini bertujuan untuk menghambat pertumbuhan mikroba lain yang tidak diinginkan sehingga didapatkan biakan yang hanya terdiri dari mikroba yang ditanamkan<sup>26</sup>. Perbandingan eluen yang digunakan adalah kloroform:etanol:air (15:6:1). Pemilihan sistem pelarut yang tepat untuk analisis KLT didasarkan pada prinsip "like dissolves like". Namun, untuk mempercepat prosesnya, kita bisa memanfaatkan pengalaman peneliti sebelumnya yang telah berhasil menggunakan kombinasi pelarut tertentu untuk analit sejenis.

Sebelum menotolkan sampel pada lempeng KLT, eluen yang akan digunakan perlu dijamin jenuh terlebih dahulu. Hal ini dilakukan dengan menempatkan kertas saring di dalam chamber yang berisi eluen. Ketika eluen telah mencapai titik jenuh, eluen akan merembes keluar melalui kertas saring selama proses elusi. Silika gel pada lempeng KLT akan bertindak sebagai fase diam dan mengabsorpsi fase gerak, yaitu eluen yang telah jenuh. Proses penjenuhan bejana dalam KLT bertujuan untuk memastikan seluruh permukaan bejana terisi uap eluen secara merata<sup>27</sup>. Hal ini penting untuk menghasilkan pergerakan noda yang baik dan seragam pada silika gel, yang merupakan fase diam dalam KLT. Penjenuhan bejana dengan uap eluen membantu menciptakan kondisi yang optimal untuk pemisahan senyawa yang efektif<sup>28,29</sup>.

Setelah menyelesaikan kromatografi lapis tipis (KLT), langkah selanjutnya adalah melakukan KLT-Bioautografi. Metode ini bertujuan untuk mengidentifikasi komponen senyawa antibakteri dalam ekstrak etanol daun stevia (*Stevia rebaudiana*). Indikasi keberadaan senyawa antibakteri ditandai dengan munculnya zona hambat (bening) pada hasil KLT-Bioautografi. Bioautografi (kontak) merupakan sebuah metode pendeteksian yang bertujuan untuk menemukan senyawa antimikroba yang belum teridentifikasi. Metode ini bekerja dengan melokalisir aktivitas antimikroba pada kromatogram<sup>30-32</sup>. Dalam pelaksanaannya, metode ini memanfaatkan teknik Kromatografi Lapis Tipis (KLT).

## SIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil penelitian, bakteri uji termasuk *Vibrio cholerae*, *Shigella dysenteriae*, *Escherichia coli*, dan *Salmonella typhi* semuanya dapat dihambat oleh ekstrak etanol daun stevia (*Stevia rebaudiana*). Dua bercak aktif dengan nilai Rf 0,88 dan 0,27 diperoleh dari profil bioautogram aktivitas antibakteri ekstrak

etanol daun stevia (*Stevia rebaudiana*) dengan TLC-Bioautografi pada bakteri uji *Shigella dysenteriae*. Tiga bercak aktif pada bakteri *Salmonella typhi* ditemukan, dan nilai Rf-nya adalah 0,88, 0,57, dan 0,27. Tiga area aktif pada bakteri *Escherichia coli* ditemukan, dan nilai Rf-nya adalah 0,88, 0,57, dan 0,27. Tiga bercak aktif pada bakteri *Vibrio cholerae* ditemukan, dan nilai Rf-nya adalah 0,88, 0,57, dan 0,27. Dapat disimpulkan bahwa daun stevia (*Stevia rebaudiana*) memiliki aktivitas sebagai antibakteri. Disarankan pengujian lebih lanjut diperlukan untuk memastikan aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun stevia (*Stevia rebaudiana*) terhadap bakteri dari beberapa gangguan infeksi berbeda menggunakan berbagai teknik, seperti metode difusi agar.

#### DAFTAR PUSTAKA

1. Marzaman, A. N. F. *et al.* Recent Advances in Pharmaceutical Approaches of Antimicrobial Agents for Selective Delivery in Various Administration Routes. *Antibiotics* **12**, 822 (2023).
2. Rajab, A. A. H. & Hegazy, W. A. H. What's old is new again: Insights into diabetic foot microbiome. *World J Diabetes* **14**, 680–704 (2023).
3. Chen, L. *et al.* Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget* **9**, 7204–7218 (2018).
4. Nash, A. A., Dalziel, R. G. & Fitzgerald, J. R. Mechanisms of Cell and Tissue Damage. in *Mims' Pathogenesis of Infectious Disease* 171–231 (Elsevier, 2015). doi:10.1016/B978-0-12-397188-3.00008-1.
5. Badr, H. S. *et al.* Spatiotemporal variation in risk of *Shigella* infection in childhood: a global risk mapping and prediction model using individual participant data. *Lancet Glob Health* **11**, e373–e384 (2023).
6. Muteeb, G., Rehman, M. T., Shahwan, M. & Aatif, M. Origin of Antibiotics and Antibiotic Resistance, and Their Impacts on Drug Development: A Narrative Review. *Pharmaceuticals* **16**, 1615 (2023).
7. Murugaiyan, J. *et al.* Progress in Alternative Strategies to Combat Antimicrobial Resistance: Focus on Antibiotics. *Antibiotics* **11**, 200 (2022).
8. Amaning Danquah, C., Minkah, P. A. B., Osei Duah Junior, I., Amankwah, K. B. & Somuah, S. O. Antimicrobial Compounds from Microorganisms. *Antibiotics* **11**, 285 (2022).
9. Muteeb, G., Rehman, M. T., Shahwan, M. & Aatif, M. Origin of Antibiotics and Antibiotic Resistance, and Their Impacts on Drug Development: A Narrative Review. *Pharmaceuticals* **16**, 1615 (2023).
10. Miethke, M. *et al.* Towards the sustainable discovery and development of new antibiotics. *Nat Rev Chem* **5**, 726–749 (2021).
11. Ahmed, S. K. *et al.* Antimicrobial resistance: Impacts, challenges, and future prospects. *Journal of Medicine, Surgery, and Public Health* **2**, 100081 (2024).
12. Vaou, N., Stavropoulou, E., Voidarou, C., Tsigalou, C. & Bezirtzoglou, E. Towards Advances in Medicinal Plant Antimicrobial Activity: A Review Study on Challenges and Future Perspectives. *Microorganisms* **9**, 2041 (2021).
13. Manikam, A. S., Pertiwi, W. S., Hidayanto, A. & Harismah, K. Potensi Ekstrak Daun Stevia ( *Stevia Rebaudiana* Bertoni ) pada Formulasi Obat Kumur Terhadap Aktivitas Antibakteri *Streptococcus Mutans*. *The 6th University Research Colloquium* 27–34 (2017).
14. Manikam, A. S., Pertiwi, W. S., Hidayanto, A. & Harismah, K. Potensi Ekstrak Daun Stevia ( *Stevia Rebaudiana* Bertoni ) pada Formulasi Obat Kumur Terhadap Aktivitas Antibakteri *Streptococcus Mutans*. *The 6th University Research Colloquium* 27–34 (2017).
15. Putri, A. V. A. A., Hafida, N. & Megawati, V. Pengaruh daya antibakteri ekstrak daun stevia(*Stevia rebaudiana bertoni*) pada konsentrasi 5%, 10%, 20%, 40%, dan 80% terhadap *Streptococcus mutans* (in vitro). *Jurnal Ilmu Kedokteran Gigi* **1**, 9–14 (2017).

16. Mboi, N. *et al.* The state of health in Indonesia's provinces, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet Glob Health* **10**, e1632–e1645 (2022).
17. Afonso, A. C., Oliveira, D., Saavedra, M. J., Borges, A. & Simões, M. Biofilms in Diabetic Foot Ulcers: Impact, Risk Factors and Control Strategies. *Int J Mol Sci* **22**, 8278 (2021).
18. Shen, H. *et al.* The 12 Gastrointestinal Pathogens Spectrum of Acute Infectious Diarrhea in a Sentinel Hospital, Shenzhen, China. *Front Microbiol* **7**, (2016).
19. Krumkamp, R. *et al.* Gastrointestinal Infections and Diarrheal Disease in Ghanaian Infants and Children: An Outpatient Case-Control Study. *PLoS Negl Trop Dis* **9**, e0003568 (2015).
20. Borgo, J., Laurella, L. C., Martini, F., Catalán, C. A. N. & Sülsen, V. P. Stevia Genus: Phytochemistry and Biological Activities Update. *Molecules* **26**, 2733 (2021).
21. Jahangir Chughtai, M. F. *et al.* Nutritional and therapeutic perspectives of *Stevia rebaudiana* as emerging sweetener; a way forward for sweetener industry. *CyTA - Journal of Food* **18**, 164–177 (2020).
22. Orellana-Paucar, A. M. Steviol Glycosides from *Stevia rebaudiana*: An Updated Overview of Their Sweetening Activity, Pharmacological Properties, and Safety Aspects. *Molecules* **28**, 1258 (2023).
23. Sanders, E. R. Aseptic Laboratory Techniques: Plating Methods. *Journal of Visualized Experiments* (2012) doi:10.3791/3064.
24. Hess, S. *et al.* In vivo partial reprogramming by bacteria promotes adult liver organ growth without fibrosis and tumorigenesis. *Cell Rep Med* **3**, 100820 (2022).
25. Bertrand, R. L. Lag Phase Is a Dynamic, Organized, Adaptive, and Evolvable Period That Prepares Bacteria for Cell Division. *J Bacteriol* **201**, (2019).
26. Bonnet, M., Lagier, J. C., Raoult, D. & Khelaifia, S. Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. *New Microbes New Infect* **34**, 100622 (2020).
27. Mahato, N., Sinha, M., Sharma, K., Koteswararao, R. & Cho, M. H. Modern Extraction and Purification Techniques for Obtaining High Purity Food-Grade Bioactive Compounds and Value-Added Co-Products from Citrus Wastes. *Foods* **8**, 523 (2019).
28. Alharbi, W. N., Saeed, W. S., Alwarthan, A. A., Badjah-Hadj-Ahmed, A. Y. & Aouak, T. Extraction of Organic Volatile Pollutants in Over-Saturated Water by Pervaporation Technique Using a Poly (Dimethylsiloxane)-Based Sealer as a Membrane. *Water (Basel)* **13**, 1049 (2021).
29. Wrona, O., Rafińska, K., Walczak-Skierska, J., Możejński, C. & Buszewski, B. Extraction and Determination of Polar Bioactive Compounds from Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Using Supercritical Techniques. *Molecules* **24**, 4608 (2019).
30. Choma, I. & Jesionek, W. TLC-Direct Bioautography as a High Throughput Method for Detection of Antimicrobials in Plants. *Chromatography* **2**, 225–238 (2015).
31. Ristivojević, P. *et al.* Antimicrobial Activity of Serbian Propolis Evaluated by Means of MIC, HPTLC, Bioautography and Chemometrics. *PLoS One* **11**, e0157097 (2016).
32. Alharbi, W. N., Saeed, W. S., Alwarthan, A. A., Badjah-Hadj-Ahmed, A. Y. & Aouak, T. Extraction of Organic Volatile Pollutants in Over-Saturated Water by Pervaporation Technique Using a Poly (Dimethylsiloxane)-Based Sealer as a Membrane. *Water (Basel)* **13**, 1049 (2021).