

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

1. Determinasi tanaman

Tahap pertama dalam penelitian ini adalah determinasi tanaman yang dilakukan di Laboratorium Program Studi Biologi Fakultas MIPA Universitas Sebelas Maret Surakarta. Determinasi tanaman dilakukan dengan tujuan membuktikan kebenaran tanaman yang digunakan untuk penelitian dan menghindari terjadinya kesalahan dalam pengambilan bahan. Hasil determinasi dapat dilihat pada kunci determinasi di bawah ini :

1b-2b-3b-4b-12b-13b-14b-17b-18b-19b-20b-21b-22b-23b-24b-25b-26b-27a-28b-29b-30b-31a-32a-33a-34a-35a-36d-37b-38b-39b-41b-42b-44b-45b-46e-50b-51b-53b-54b-56b-57b-58b-59d-72b-73b-74a-75b-76b-333b-334b-335b-336b-345b-346b-348b-349a-350b-351a-352a_____ **84. Myrtaceae**
1a-2b-3b-7b-8b-9b-10b_____ **9. Syzygium**
1b-7b-8b-11b-13b-14b-15a-16b-18b-20a_____ ***Syzygium myrtifolium* Walp.**

2. Pengambilan bahan

Bahan baku sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun muda tanaman pucuk merah yang diperoleh dari *Edu Park* Universitas Muhammadiyah Surakarta, Jawa Tengah, pada bulan Januari tahun 2019. Pengambilan sampel dilakukan pada pagi hingga siang hari, karena pada waktu tersebut proses fotosintesis dari tumbuhan berlangsung dengan sempurna dan proses fiksasi CO₂ paling optimal, sehingga diharapkan dapat diperoleh komponen kimia yang maksimal (Lakitan 1995).

3. Pembuatan simplisia dan serbuk

Daun muda tanaman pucuk merah yang dipilih dalam keadaan baik dan tidak cacat. Pembuatan simplisia diawali dengan proses sortasi basah yang bertujuan untuk memisahkan bahan uji dari kotoran yang menempel. Daun pucuk merah dicuci dengan air mengalir, setelah ditiriskan kemudian dikeringkan menggunakan oven pada suhu 50°C sampai benar-benar kering yang ditandai dengan hancur bila diremas. Pengeringan tanaman dilakukan dengan tujuan untuk

menghentikan proses enzimatis yang mungkin masih terjadi sehingga dapat mengurangi degradasi zat aktif. Proses pengeringan juga berguna untuk mengurangi kandungan air pada simplisia sehingga tidak mudah ditumbuhi jamur. Daun pucuk merah yang telah kering diserbuk dengan *blender* dan diayak dengan ayakan no.40 dengan tujuan untuk mendapatkan partikel yang lebih kecil sehingga pelarut lebih mudah kontak dengan bahan dan berdifusi lebih banyak ke dalam partikel dan proses ekstraksi berlangsung lebih baik. Daun pucuk merah sebanyak 4,6 kg yang dikeringkan diperoleh persentase bobot kering terhadap bobot basah, hasil presentase rendemen dapat dilihat pada tabel 1. Perhitungan rendemen bobot kering terhadap bobot basah daun pucuk merah dapat dilihat pada lampiran 14.

Tabel 1. Hasil persentase rendemen bobot kering terhadap bobot basah daun pucuk merah

Bahan	Bobot basah (kg)	Bobot kering (kg)	Rendemen (%)
Daun pucuk merah	4,6	1,25	27,17

4. Pembuatan ekstrak daun pucuk merah

Proses ekstraksi dilakukan dengan menggunakan tiga jenis pelarut yang memiliki polaritas yang berbeda. Tujuan dari penggunaan pelarut yang memiliki polaritas yang berbeda yaitu untuk mendapatkan senyawa aktif berdasarkan tingkat kepolarannya, dan melihat jenis pelarut manakah yang menghasilkan rendemen ekstrak terbaik. Ekstrak daun pucuk merah diperoleh dengan metode maserasi (perendaman). Daun pucuk merah yang telah kering dan dihaluskan kemudian direndam dengan masing-masing pelarut yaitu etanol 70%, etil asetat, dan *n*-heksana selama 5 hari dengan penggojokan berulang. Penggojokan bertujuan agar larutan yang konsentrasinya tinggi terdesak keluar dan diganti oleh cairan penyari dengan konsentrasi rendah. Proses tersebut berulang sampai terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar sel dan di dalam sel. Setelah dilakukan perendaman selama 5 hari, maserat kemudian disaring dengan kain flannel kemudian disaring kembali dengan kertas saring (Anonim 1986). Filtrat yang diperoleh dipekatkan dengan alat *rotary evaporator* dengan suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak kental, dari masing-masing 300 gram serbuk daun pucuk merah diperoleh ekstrak etanol sebanyak 200 gram, ekstrak etil asetat sebanyak 30

gram, dan ekstrak *n*-heksana sebanyak 14 gram. Perhitungan rendemen ekstrak terhadap serbuk dapat dilihat pada lampiran 15.

Tabel 2. Hasil persentase rendemen ekstrak terhadap serbuk daun pucuk merah.

Pelarut	Bobot serbuk (g)	Bobot ekstrak (g)	Rendemen (%)
Etanol 70%	300	200	66,67
Etil asetat	300	30	10
<i>n</i> -heksana	300	14	4,67

Semakin besar nilai rendemen yang dihasilkan artinya jumlah ekstrak yang dihasilkan semakin banyak. Faktor-faktor yang mempengaruhi efektivitas proses ekstraksi antara lain jenis pelarut yang digunakan sebagai penyari, ukuran partikel simplisia, metode dan lamanya ekstraksi. Besar kecilnya rendemen ekstrak juga menunjukkan banyaknya komponen aktif yang terkandung di dalam ekstrak (Permawati 2008). Dari hasil penelitian terlihat bahwa nilai rendemen tertinggi terdapat pada ekstrak etanol daun pucuk merah sebesar 66,67%, diikuti oleh nilai rendemen ekstrak etil asetat sebesar 10% dan ekstrak *n*-heksana dengan rendemen sebesar 4,67%. Hal ini menunjukkan bahwa sampel daun pucuk merah lebih banyak mengandung senyawa polar karena rendemen ekstrak tertinggi diperoleh dari pelarut etanol 70%. Sebaliknya, komponen senyawa aktif yang bersifat semipolar dan non polar terdapat dalam jumlah yang lebih kecil pada daun pucuk merah. Pelarut seperti etanol yang bersifat polar akan mengekstraksi senyawa fenol dari daun pucuk merah. Pelarut semi polar mampu mengekstrak senyawa fenol, terpenoid, alkaloid, aglikon dan glikosida. Sedangkan Pelarut non polar dapat mengekstrak senyawa kimia seperti lilin, lipid dan minyak yang mudah menguap (Harborne 1987).

5. Penentuan susut pengeringan serbuk dan ekstrak daun pucuk merah

Penentuan susut pengeringan daun pucuk merah menggunakan alat *moisture balance*. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk daun pucuk merah didapatkan rata-rata sebesar 9,4%. Data selengkapnya dapat dilihat pada tabel 2. Dari data tersebut kadar lembab serbuk daun pucuk merah memenuhi syarat dimana kadar lembab serbuk simplisia tidak boleh lebih dari 10%. Kadar lembab serbuk kurang dari 10% sel dalam keadaan mati, enzim tidak aktif, serta bakteri dan jamur tidak dapat tumbuh sehingga serbuk simplisia lebih awet (Katno *et al.* 2008). Hasil

penetapan susut pengeringan ekstrak etanol, etil asetat, dan *n*-heksana daun pucuk merah memiliki rata-rata susut pengeringan masing-masing sebesar 13%, 11% dan 13% . Hasil selengkapnya dapat terlihat pada tabel 3.

Tabel 3. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk daun pucuk merah

Serbuk	Kadar lembab (%)
20 gram	9,5
20 gram	8,0
20 gram	10,9
Rata-rata \pm SD	9,46 \pm 1,45

Tabel 4. Hasil penetapan susut pengeringan ekstrak daun pucuk merah

Ekstrak	Ekstrak etanol (%)	Ekstrak etil asetat (%)	Ekstrak <i>n</i> -heksan (%)
	13,10	11,0%	13,0%
	13,0	11,0%	13,0%
	13,0	11,0%	13,0%
Rata-rata \pm SD	13,03 \pm 0,05	11,00 \pm 0,00	13,00 \pm 0,00

Penetapan parameter susut pengeringan ditujukan untuk melihat kandungan senyawa-senyawa yang mudah menguap. Nilai susut pengeringan besar menunjukkan banyaknya senyawa mudah menguap yang terkandung dalam ekstrak. Hal ini perlu diperhatikan agar penanganan ekstrak tidak salah karena senyawa-senyawa mudah menguap juga kemungkinan memiliki aktivitas.

6. Pengujian bebas etanol

Hasil pengujian bebas etanol pada ekstrak etanol 70% daun pucuk merah menunjukkan positif bebas etanol karena tidak tercium bau ester setelah dilakukan pemanasan dengan penambahan asam asetat dan asam sulfat pekat (Tabel 5). Uji bebas etanol dilakukan untuk memastikan ekstrak terbebas dari etanol sehingga didapatkan ekstrak yang murni, serta mencegah terjadinya kesalahan pengamatan dalam tahap penelitian selanjutnya yaitu pengujian aktivitas antibakteri terhadap bakteri *S.typhi* ATCC 13311 sebab etanol memiliki aktivitas dalam menghambat pertumbuhan bakteri.

Tabel 5. Hasil uji bebas etanol ekstrak etanol 70% daun pucuk merah

Identifikasi	Prosedur	Hasil
Uji bebas etanol	Ekstrak +H ₂ SO ₄ (p) + CH ₃ COOH→dipanaskan	Tidak tercium bau ester

7. Identifikasi kandungan kimia

Serbuk dan ekstrak daun pucuk merah yang diperoleh kemudian diidentifikasi kandungan kimianya. Hasil identifikasi kandungan kimia serbuk dan ekstrak daun pucuk merah dapat dilihat pada tabel 6 dan tabel 7.

Tabel 6. Hasil identifikasi kandungan kimia serbuk daun pucuk merah.

Golongan senyawa	Hasil		
	Serbuk	Pustaka	Ket
Flavonoid	Terbentuk warna jingga	Reaksi positif ditunjukkan dengan warna merah atau jingga pada amil alkohol (Harborne 1987).	+
Alkaloid	Dragendorff : terbentuk endapan coklat Mayer : terbentuk endapan putih kekuningan	Terbentuk endapan merah sampai jingga pada reagen Dragendorff dan terbentuk endapan putih kekuningan pada reagen Mayer (Harborne 1987).	+
Saponin	Terbentuk busa	Reaksi positif ditunjukkan dengan adanya busa yang stabil dan setelah ditambahkan 1 tetes HCl 2N busa tidak hilang (Harborne 1987)	+
Fenolik	Terbentuk warna hitam	Reaksi positif ditunjukkan dengan adanya warna hijau, merah ungu, biru dan hitam (Harborne 1987).	+

Keterangan

+ : Ada senyawa

- : Tidak ada senyawa

Tabel 7. Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak daun pucuk merah.

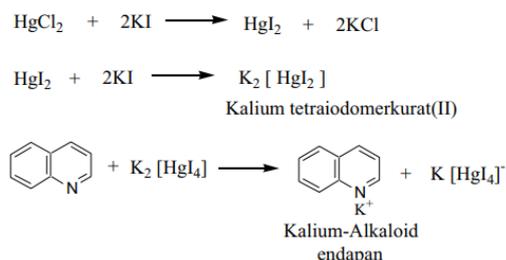
Golongan senyawa	Hasil			Pustaka
	Ekstrak etanol	Ekstrak etil asetat	Ekstrak <i>n</i> -heksana	
Flavonoid	Terbentuk warna jingga (+)	Terbentuk warna jingga (+)	Terbentuk warna kuning (+)	Reaksi positif ditunjukkan dengan warna merah atau jingga pada amil alkohol (Harborne 1987).
Alkaloid	Dragendorff : terbentuk endapan coklat Mayer : terbentuk endapan putih kekuningan (+)	Dragendorff : Terbentuk endapan coklat Mayer : Terbentuk endapan putih (+)	Dragendorff : Terbentuk endapan coklat Mayer : Terbentuk endapan putih (+)	Terbentuk endapan merah sampai jingga pada reagen Dragendorff dan terbentuk endapan putih kekuningan pada reagen Mayer (Harborne 1987).
Saponin	Terbentuk busa (+)	Terbentuk busa (+)	Tidak terbentuk busa (-)	Reaksi positif ditunjukkan dengan adanya busa yang stabil dan setelah ditambahkan 1 tetes HCl 2N busa tidak hilang (Harborne 1987).
Fenolik	Terbentuk warna hitam (+)	Terbentuk warna hitam (+)	Tidak terjadi perubahan warna (-)	Reaksi positif ditunjukkan dengan adanya warna hijau, merah ungu, biru dan hitam (Robinson 1995).

Data pada tabel 6 dan tabel 7 menunjukkan bahwa hasil identifikasi kandungan kimia pada serbuk dan ekstrak daun pucuk merah mengandung alkaloid, saponin, flavonoid, dan fenolik, kandungan kimia tersebut diduga mempunyai aktivitas antibakteri. Flavonoid merupakan kelompok besar fitokimia yang bersifat melindungi dan banyak terdapat pada tanaman.

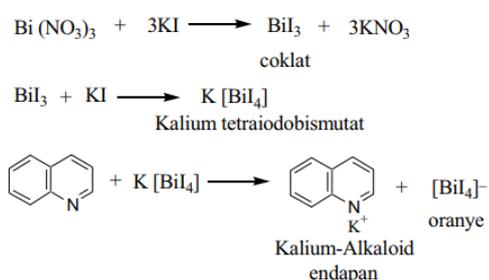
Hasil identifikasi kandungan kimia pada serbuk daun pucuk merah, ekstrak etanol, dan ekstrak etil asetat diperoleh kandungan flavonoid dengan intensitas yang kuat, ditunjukkan dengan adanya warna jingga. Sedangkan untuk ekstrak *n*-heksan intensitasnya rendah, ditunjukkan dengan terbentuknya warna kuning. Hal ini dikarenakan senyawa golongan flavonoid bersifat polar sehingga lebih larut dalam pelarut yang bersifat polar dan semi polar. Kepolaran senyawa tersebut dikarenakan flavonoid merupakan senyawa polihidroksi (memiliki lebih dari satu gugus hidroksil) (Harborne 1987). Penambahan serbuk magnesium dan asam klorida pada pengujian flavonoid akan menyebabkan tereduksinya senyawa flavonoid yang ada sehingga menimbulkan reaksi warna kuning hingga jingga yang merupakan ciri adanya flavonoid (Robinson 1995).

Saponin memiliki merupakan senyawa yang mempunyai gugus hidrofilik dan hidrofob. Saponin pada saat digojok terbentuk buih karena adanya gugus hidrofil yang berikatan dengan air sedangkan hidrofob akan berikatan dengan udara. Dalam identifikasi kandungan kimia pada serbuk daun pucuk merah, ekstrak etanol, dan ekstrak etil asetat terdapat kandungan saponin, ditunjukkan dengan terbentuknya busa yang stabil setelah dilakukan penambahan larutan HCl 2N. Penambahan HCl 2N bertujuan untuk menambah kepolaran sehingga gugus hidrofil akan berikatan lebih stabil dan buih yang terbentuk menjadi stabil.

Hasil identifikasi kandungan kimia pada serbuk daun pucuk merah, ekstrak etanol, ekstrak etil asetat, dan ekstrak *n*-heksan menunjukkan adanya kandungan alkaloid, dibuktikan dengan terbentuknya endapan setelah ditetesi pereaksi Mayer dan Dragendorff. Pada uji alkaloid dengan pereaksi Mayer, diperkirakan nitrogen pada alkaloid akan bereaksi dengan ion logam K^+ dari kalium tetraiodomercurat (II) membentuk kompleks kalium-alkaloid yang mengendap. Sedangkan dengan pereaksi Dragendorff, nitrogen pada alkaloid akan membentuk ikatan kovalen koordinat dengan K^+ yang merupakan ion logam sehingga terbentuk endapan jingga (Marliana 2005).



Gambar 7. Perkiraan reaksi senyawa alkaloid dengan reagen Mayer (Miroslav 1971)



Gambar 8. Perkiraan reaksi senyawa alkaloid dengan reagen Dragendorff (Miroslav 1971).

8. Pembuatan suspensi bakteri uji

Bakteri uji *Salmonella typhi* ATCC 13311 dari biakan murni diambil satu sampai dua ose kemudian dimasukkan dalam tabung yang berisi 10 ml media BHI steril secara aseptis. Kekeruhan suspensi bakteri uji disesuaikan dengan kekeruhan standar Mc Farland 0,5 agar jumlah bakteri yang digunakan sama selama penelitian. Standar McFarland 0,5 memiliki kekeruhan sebanding dengan $1,5 \times 10^8$ colony forming unit (CFU)/ml.

9. Identifikasi bakteri uji *Salmonella typhi* ATCC 13311

9.1 Identifikasi dengan goresan. *Salmonella typhi* ATCC 13311 diinokulasikan pada media SSA dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil pengujian menunjukkan terbentuknya koloni berwarna bening dengan titik hitam seperti mata ikan. Koloni berwarna bening dengan titik hitam dapat terbentuk karena *S.typhi* dapat menghasilkan H_2S yang ditandai dengan adanya endapan hitam pada media SSA. Media SSA mengandung besi ammonium sitrat yang bereaksi dengan H_2S dan menghasilkan endapan hitam pada pusat koloni (Delost 2015). Bakteri *Salmonella typhi* menunjukkan perubahan warna pada

media SSA dari warna merah menjadi warna kuning. Warna kuning ini menandakan bakteri memfermentasikan glukosa (Budiarso *et al* 2009). Hasil identifikasi *S.typhi* dengan goresan dapat dilihat pada lampiran 9.

9.2 Identifikasi dengan pewarnaan Gram. Identifikasi *Salmonella typhi* ATCC 13311 dengan pewarnaan Gram membuktikan bahwa bakteri *S.typhi* merupakan bakteri gram negatif. Hasil pengamatan menunjukkan bakteri berbentuk batang dan berwarna merah. Bakteri Gram negatif mempunyai tiga lapisan yaitu lapisan luar berupa lipoprotein, lapisan tengah lipopolisakarida dan lapisan dalam berupa peptidoglikan. Pewarnaan Gram dimulai dengan pemberian kristal violet sebagai pewarna utama dan iodine sebagai penguat warna sehingga bakteri akan berwarna merah. Dilanjutkan dengan pemberian alkohol yang berfungsi untuk membilas atau melunturkan kelebihan zat pewarna pada sel bakteri. Alkohol akan mudah memasuki membran luar sel bakteri Gram negatif karena struktur membran yang didominasi oleh lipid, sehingga kompleks kristal violet yang telah terbentuk akan terekstraksi dan luntur. Pemberian safranin berfungsi untuk mewarnai kembali sel-sel yang telah kehilangan pewarna utama sehingga bakteri Gram negatif akan berwarna merah (Amri *et al* 2017).

Tujuan pewarnaan Gram untuk memudahkan melihat bakteri dengan mikroskop, memperjelas ukuran dan bentuk bakteri, untuk melihat struktur luar dan struktur dalam bakteri seperti dinding sel dan vakuola, menghasilkan sifat-sifat fisik dan kimia yang khas daripada bakteri dengan zat warna, serta meningkatkan kontras mikroorganisme dengan sekitarnya (Pelczar & Chan, 1986).

9.3 Identifikasi secara biokimia. Pengujian biokimia menggunakan media KIA (*Kliger Iron Agar*) bertujuan untuk mengetahui apakah bakteri dapat melakukan fermentasi karbohidrat (glukosa dan laktosa). Uji biokimia bakteri *S.typhi* menggunakan media KIA diperoleh bagian lereng berwarna merah, bagian dasar berwarna kuning, menghasilkan gas H₂S yang ditandai dengan adanya endapan hitam, serta medium terangkat keatas. Media KIA mengandung dua macam karbohidrat yaitu glukosa dan laktosa. Hasil pengujian menunjukkan bagian lereng berwarna merah karena bakteri bersifat basa, suasana basa

menunjukkan glukosa telah habis di fermentasi oleh bakteri sebagai sumber energi dan bakteri menggunakan pepton sebagai sumber energinya. Pada bagian dasar terbentuk warna hitam karena bakteri mampu menghasilkan H_2S kemudian gugus S akan berikatan dengan Fe membentuk FeS yang berwarna hitam dan mengendap (Hadioetomo 1985). Menurut Brooks *et al* (2005) bakteri *Salmonella sp* tidak dapat menfermetasi laktosa dan sukrosa. Bakteri ini hanya dapat memfermentasi glukosa dan manitol sebagai sumber energi.

Uji biokimia menggunakan media LIA (*Lysine Iron Agar*) bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam mendekarboksilasi lisin membentuk amin kadaverin yang bersifat basa. Enzim dekarboksilase spesifik mampu menyerang asam amino pada gugus karboksil yang menghasilkan amin atau diamin dan karbondioksida. Proses dekarboksilasi terbatas pada asam amino yang memiliki sedikitnya satu gugus aktif seperti amina atau karboksil. Kadaverin adalah senyawa stabil yang dihasilkan proses ini pada keadaan anaerob. Uji ini memberikan warna ungu keruh kecoklatan yang menandakan dihasilkannya kadaverin yang menyatakan isolat positif terhadap uji. Hasil uji biokimia bakteri *S.typhi* menggunakan media LIA diperoleh bagian lereng berwarna ungu gelap dan terdapat warna hitam pada bagian dasar media. Warna hitam terbentuk karena bakteri menghasilkan hidrogen sulfida (H_2S) sebagai akibat reduksi tiosulfat. Hidrogen sulfida kemudian akan bereaksi dengan besi pada medium membentuk endapan hitam besi sulfida (Bell 2002).

Uji biokimia menggunakan media SIM (*Sulfida Indol Motility*) bertujuan untuk mengetahui terbentuknya sulfide, indol, dan motilitas bakteri. Uji biokimia bakteri *S.typhi* menggunakan media SIM diperoleh hasil + - + yang berarti media berubah menjadi hitam, tidak terbentuk cincin indol setelah ditambah reagen erlich, dan pertumbuhan bakteri menyebar pada seluruh media. Pada pengujian Sulfida diperoleh hasil warna media menjadi hitam menunjukkan bahwa bakteri menghasilkan H_2S yang bereaksi dengan Fe sehingga membentuk endapan hitam H_2S pada media. Uji indol bertujuan untuk mengidentifikasi kemampuan bakteri menghasilkan indol dengan menggunakan enzim tryptophanase. Produksi indol di dalam media dimungkinkan karena adanya tryptophan. Tryptophan adalah asam

amino esensial, yang teroksidasi oleh beberapa bakteri yang mengakibatkan pembentukan indol, asam piruvat, dan amonia (Hemraj 2013). Hasil pengujian indol menunjukkan hasil negatif ditandai dengan tidak terbentuknya cincin berwarna merah setelah penambahan reagen erlich, hal ini menunjukkan bahwa bakteri *S.typhi* tidak menghasilkan enzim tryptophanase yang akan memecah tryptophan menjadi indol. Uji motilitas bakteri *S.typhi* menunjukkan hasil positif yang ditandai dengan pertumbuhan bakteri menyebar menjauhi garis inokulasi. Hal ini berarti bahwa bakteri memiliki flagella yang digunakan untuk bergerak.

Uji biokimia menggunakan media sitrat bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menggunakan sitrat sebagai sumber karbon tunggal. Jika bakteri mampu menggunakan sitrat sebagai sumber karbonnya maka akan menaikkan pH dan mengubah warna medium biakan dari hijau menjadi biru (Sunarjo 1994). Pada uji biokimia bakteri *S.typhi* menggunakan media sitrat diperoleh hasil media berubah warna menjadi biru (positif).

10. Pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi dan dilusi

10.1 Pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi. Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak daun pucuk merah terhadap bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311 dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta dengan metode difusi agar. Pengujian aktivitas antibakteri dengan tingkat konsentrasi yang berbeda bertujuan untuk melihat pengaruh setiap konsentrasi ekstrak pada bakteri yang diujikan. Semakin besar suatu konsentrasi maka semakin besar pula diameter zona hambat yang terbentuk. Perbedaan daya hambat disebabkan oleh perbedaan sensitivitas organisme, mekanisme dan kesinergisan kerja antara senyawa aktif di dalam ekstrak maupun minyak atsirinya (Silawati 2018). Hasil pengujian aktivitas antibakteri ekstrak daun pucuk merah dapat dilihat pada tabel 9.

Tabel 8. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak daun pucuk merah.

Sampel	Konsentrasi	Diameter hambat (mm)			Rata-rata (mm)
		I	II	III	\pm SD
Ekstrak etanol	20%	9,00	7,00	7,00	7,67 \pm 1,15
	25%	7,00	6,00	7,00	6,67 \pm 0,58
	30%	9,00	8,00	8,00	8,33 \pm 0,58
	35%	9,00	10,00	7,00	8,67 \pm 1,53
Ekstrak etil asetat	20%	15,00	6,00	10,00	10,33 \pm 4,51
	25%	13,00	11,00	19,00	14,33 \pm 4,16
	30%	17,00	16,00	12,00	15 \pm 2,64
	35%	16,00	10,00	12,00	12,67 \pm 3,05
Ekstrak n-heksan	20%	10,00	10,00	7,00	9 \pm 1,73
	25%	11,00	11,00	6,00	9,33 \pm 2,89
	30%	8,00	11,00	7,00	8,67 \pm 2,08
	35%	11,00	7,00	7,00	8,33 \pm 2,31
Kontrol positif Ciprofloksasin		25,00	23,00	21,20	23,07 \pm 1,90
Kontrol negatif		0	0	0	0

Berdasarkan data yang diperoleh dilakukan analisis statistik, untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan daya hambat yang signifikan dari sampel ekstrak daun pucuk merah. Data hasil uji aktivitas antibakteri dilakukan uji normalitas menggunakan uji *One-Sample Kolmogorove-Smirnov* dan diperoleh signifikansi $0,149 > 0,05$ maka H_0 diterima, data tersebut terdistribusi normal sehingga dapat dilanjutkan uji *One Way ANOVA*. Hasil pengujian statistik menggunakan *One Way ANOVA* didapatkan hasil bahwa nilai $p = 0,000 < 0,05$ yang berarti tiap sampel uji terdapat perbedaan nyata dalam menghambat *Salmonella typhi* ATCC 13311. Untuk mengetahui kelompok perlakuan mana yang memiliki perbedaan bermakna tersebut, maka dilanjutkan analisis *post-hoc*. Hasil analisis statistik uji *ANOVA* dan *post hoc* dapat dilihat pada lampiran 18.

Berdasarkan data hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak daun pucuk merah pada tabel 9 terlihat bahwa masing-masing kelompok konsentrasi dapat membentuk zona hambat. Ekstrak etanol konsentrasi 20%, 25%, 30% dan 35% dapat membentuk diameter zona hambat dengan rata-rata ukuran zona hambat secara berurutan sebesar 7,67 mm; 6,67 mm; 8,33 mm; dan 8,67 mm. Ekstrak etil asetat konsentrasi 20%, 25%, 30% dan 35% dapat membentuk diameter zona

hambat dengan rata-rata secara berurutan sebesar 10,33 mm; 14,33 mm; 15 mm; dan 12,67 mm. ekstrak *n*-heksana konsentrasi 20%, 25%, 30% dan 35% dapat membentuk diameter zona hambat dengan rata-rata secara berurutan sebesar 9 mm; 9,33 mm; 8,67 mm; dan 8,33mm. Kontrol positif ciprofloksasin dapat membentuk diameter zona hambat rata-rata sebesar 23,07 mm. Sedangkan pada kontrol negatif tidak membentuk zona hambat pada medium yang ditumbuhi *Salmonella typhi* ATCC 13311. Penelitian ini menggunakan tiga jenis kontrol negatif yang berbeda yaitu DMSO 5%, tween 80 10%, dan CMC Na 0,5%. Pada umumnya ekstrak diencerkan dengan DMSO 5% yang sekaligus digunakan sebagai kontrol negatif. Namun dalam penelitian ini digunakan pelarut lain yaitu tween 80 10% dan CMC Na 0,5% karena ekstrak etil asetat dan ekstrak *n*-heksana yang didapat sukar larut terhadap DMSO 5%. Sehingga digunakan tween 80 10% untuk mengencerkan ekstrak etil asetat dan CMC Na 0,5% untuk mengencerkan ekstrak *n*-heksana. Setelah dilakukan pengujian, tween 80 10% dan CMC Na 0,5% tidak menghasilkan daerah bening di sekitar bakteri, hal ini sejalan dengan penelitian Wardhani (2012) dan Wahyudin (2017) yang menyatakan bahwa Tween 10% dan CMC Na 0,5% dapat dijadikan sebagai suspending agent karena tidak mengganggu pertumbuhan dari bakteri yang dapat mengganggu hasil penelitian. Kontrol negatif berfungsi memperlihatkan bahwa suspending agent yang digunakan tidak memiliki efek untuk menghambat pertumbuhan bakteri sehingga aktivitas antibakteri yang dihasilkan murni berasal dari ekstrak yang diuji. Kontrol positif menggunakan antibiotik siprofloksasin. Siprofloksasin menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara menghambat sintesis asam nukleat dimana antibiotik golongan ini dapat masuk ke dalam sel dengan cara difusi pasif melalui kanal protein terisi air (porins) pada membran luar bakteri secara intra seluler, secara unik obat-obat ini menghambat replikasi DNA bakteri dengan cara mengganggu kerja DNA gyrase (topoisomerase II) selama pertumbuhan dan reproduksi bakteri.

Daun pucuk merah memiliki kandungan flavonoid, alkaloid, saponin, dan fenolik yang dapat memiliki aktivitas antibakteri. Mekanisme kerja flavonoid sebagai antibakteri adalah membentuk senyawa kompleks dengan protein

ekstraseluler dan terlarut sehingga dapat merusak membran sel bakteri dan diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler (Darmawati *et al* 2015). Mekanisme kerja alkaloid sebagai antibakteri diprediksi melalui penghambatan sintesis dinding sel yang akan menyebabkan lisis pada sel sehingga sel akan mati (Nikham 2012). Saponin memiliki aktivitas antibakteri dimana mekanisme kerjanya adalah menurunkan tegangan permukaan sehingga mengakibatkan naiknya permeabilitas atau kebocoran sel dan mengakibatkan senyawa intraseluler akan keluar (Ngajow *et al* 2015). Senyawa fenolik bersifat desinfektan yang bekerja dengan cara mendenaturasi protein yang menyebabkan aktivitas metabolisme ini akan mengakibatkan kematian sel bakteri (Miranti 2013).

Berdasarkan hasil pengukuran diameter zona hambat menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun pucuk merah memiliki daya hambat sedang, ekstrak etil asetat memiliki daya hambat yang kuat, dan ekstrak *n*-heksana memiliki daya hambat sedang. Penentuan kriteria ini berdasarkan Davis dan Stout (1971) yang melaporkan bahwa ketentuan kekuatan daya antibakteri sebagai berikut: daerah hambatan ≥ 20 mm termasuk sangat kuat, daerah hambatan 10- 20 mm kategori kuat, daerah hambatan 5-10 mm kategori sedang, dan daerah hambatan 5 mm atau kurang termasuk kategori lemah.

Pada tabel 9 terlihat bahwa diameter zona hambat yang terbesar dan mendekati diameter zona hambat kontrol positif dimiliki oleh ekstrak etil asetat. Diameter zona hambat ekstrak etil asetat konsentrasi 20%, 25%, 30%, dan 35% secara berturut-turut sebesar 10,33 mm, 14,33 mm, 15 mm, dan 12,67 mm. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Rastina *et al* (2015), konsentrasi efektif adalah konsentrasi terkecil yang daya antibakterinya dikategorikan kuat untuk membentuk zona hambat terbesar. Maka dapat disimpulkan bahwa ekstrak etil asetat daun pucuk merah dengan konsentrasi 20% merupakan konsentrasi teraktif dan efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311 karena dengan konsentrasi yang kecil sudah dapat menghasilkan diameter zona hambat yang tidak berbeda bermakna secara statistik dengan konsentrasi yang lebih tinggi.

10.2 Pengujian aktivitas antibakteri dengan metode dilusi. Pengujian aktivitas antibakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311 dengan metode dilusi dilakukan dengan menggunakan ekstrak daun pucuk merah konsentrasi 30%, 15%, 7,5%, 3,75%, 1,875%, 0,94%, 0,468% dan 0,234% serta kontrol positif (suspensi bakteri) dan kontrol negatif (ekstrak teraktif). Aktivitas antibakteri dapat diketahui dari kekeruhan pada tabung reaksi, kemudian digoreskan pada media agar. Hasil menunjukkan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) kedua sampel tidak dapat diamati karena sampel yang digunakan keruh, sehingga dilanjutkan dengan penggoresan pada media SSA. Metode dilusi bertujuan untuk mengetahui dosis minimum dari zat yang bersifat antibakteri. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ditentukan paada media SSA dengan konsentrasi terkecil yang tidak terdapat pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311.

Tabel 9. Hasil dilusi antibakteri ekstrak etil asetat 30% terhadap bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311

Konsentrasi	Replikasi I	Replikasi II	Replikasi III
30%	-	-	-
15%	-	-	-
7,5%	+	+	+
3,75%	+	+	+
1,875%	+	+	+
0,94%	+	+	+
0,468%	+	+	+
0,234%	+	+	+
K +	+	+	+
K-	-	-	-

Keterangan :

(-) : tidak ada pertumbuhan bakteri

(+) : ada pertumbuhan bakteri

Kontrol (-) : larutan stok sampel

Kontrol (+) : suspensi bakteri

Pada tabel 9 terlihat bahwa ekstrak etil asetat daun pucuk merah memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311 dengan konsentrasi bunuh minimum sebesar 15% ditandai dengan tidak adanya pertumbuhan bakteri pada media agar. Sedangkan pada konsentrasi 7,5%, 3,75%, 1,875%, 0,94%, 0,468%, 0,234% terdapat pertumbuhan koloni bakteri berwarna bening yang menandakan bahwa ekstrak etil asetat dengan konsentrasi tersebut belum mampu membunuh bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311.

Ekstrak etil asetat bersifat semi polar sehingga dapat menarik senyawa yang bersifat polar maupun semi polar. Beberapa senyawa yang dapat tertarik oleh pelarut semi polar adalah senyawa fenolik, alkaloid, triterpenoid, dan glikosida (Harborne 1987). Berdasarkan hasil identifikasi kandungan senyawa kimia, ekstrak etil asetat yang diperoleh mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, saponin, dan fenolik. Senyawa-senyawa tersebut yang berperan sebagai antibakteri pada tanaman pucuk merah. Flavonoid bekerja sebagai agen antibakteri dengan cara membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut sehingga dapat merusak membran sel bakteri dan diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler (Darmawati *et al* 2015). Mekanisme kerja alkaloid sebagai antibakteri yaitu dengan cara menghambat sintesis dinding sel yang akan menyebabkan lisis pada sel sehingga sel akan mati (Nikham 2012). Saponin memiliki aktivitas antibakteri dimana mekanisme kerjanya adalah menurunkan tegangan permukaan sehingga mengakibatkan naiknya permeabilitas atau kebocoran sel dan mengakibatkan senyawa intraseluler akan keluar (Ngajow *et al* 2015). Sedangkan senyawa fenolik bersifat desinfektan yang bekerja dengan cara mendenaturasi protein yang menyebabkan aktivitas metabolisme ini akan mengakibatkan kematian sel bakteri (Miranti 2013).